

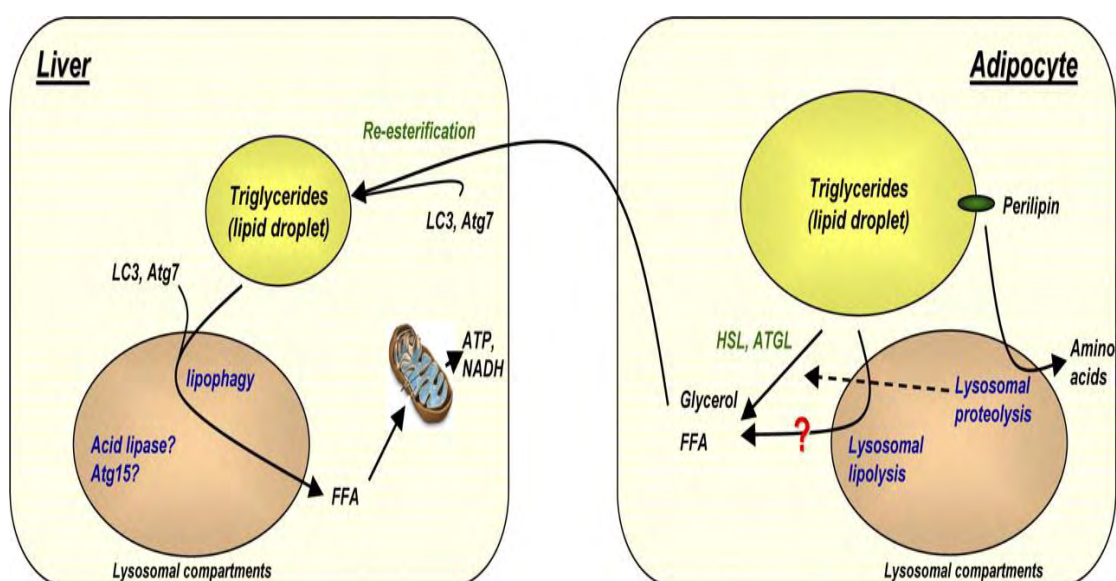
## ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

## Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και εξελικτικής Βιολογίας

Αναπτυξιακή μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης της  
λιπογένεσης στην τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Expression patterns of lipogenetic genes during early development in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*)



Διπλωματική Εργασία

Γιώργος Μιχαλέττος

Λάρισα 2017

## Τριμελής Επιτροπή

Μούτου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών -  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας - Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών - Τμήμα  
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας - Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σαραφίδου Θεολογία Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών  
Οργανισμών - Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας - Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ.Αικατερίνη Μούτου, υπό την επίβλεψη της οποίας πραγματοποιήθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία, για τη καθοδήγηση και τη βοήθεια της με στόχο την διεκπεραίωση της πειραματικής διαδικασίας και τη συγγραφή της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την διδακτορική ερευνήτρια Ελένη Γαλλιοπούλου για την βοήθεια, τη καθοδήγηση και το χρόνο της στη κατανόηση του πειράματος και στην επιτυχή διεκπεραίωση του. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα και την άψογη συνεργασία κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την στήριξή τους με κάθε πιθανό τρόπο που αυτοί καθημερινώς μου παρέχουν.

## Περίληψη

Ο λιπώδης ιστός δεν θεωρείται πλέον ένας αδρανής ιστός που σχετίζεται εξ'ολοκλήρου με την αποθήκευση ενέργειας, αλλά αναδεικνύεται σταδιακά ως ένα ενεργό ενδοκρινές όργανο και ένας σημαντικός διαμεσολαβητής που εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες όσον αφορά στον ενεργειακό μεταβολισμό του οργανισμού. Ο μεταγραφικός παράγοντας PPAR $\gamma$  σχετίζεται άμεσα με τη διαδικασία της λιπογένεσης, αποτελώντας σημαντικό παράγοντα για τη διαφοροποίηση των πρόδρομων λιποκυττάρων και την εδραίωση του λιποκυτταρικού φαινοτύπου. Ο TNF $\alpha$  ανήκει στην ομάδα των κυτοκινών και συγκεκριμένα στο σύνολο των λιποκινών, μορίων που εκκρίνονται από τον λιπώδη ιστό και έχουν ενδοκρινή, παρακρινή ή αυτοκρινή δράση. Μαζί με την λεπτίνη, η οποία ανήκει και αυτή στην ομάδα των λιποκινών, τα δύο αυτά μόρια συμμετέχουν ενεργά στη ρύθμιση του λιπιδιακού μεταβολισμού, προάγοντας τη λιπόλυση και αναστέλλοντας τη διαδικασία της λιπογένεσης. Επιπλέον, τα δύο μόρια αποτελούν συστατικά της διασταυρούμενης επικοινωνίας μεταξύ μυών και λίπους για τον έλεγχο και τη διατήρηση της ενεργειακής ομοιόστασης του οργανισμού.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης των τριών γονιδίων του PPAR $\gamma$ , του TNF $\alpha$  και της λεπτίνης κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας και μέχρι την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης. Επιπλέον, επιχειρήθηκε η συσχέτιση της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων με τη διαφορά στον ρυθμό ανάπτυξης μέχρι την 58 dph, συγκρίνοντας την έκφραση σε άτομα με στατιστικά σημαντικά διαφορετικό μέγεθος. Τέλος, τα πρότυπα έκφρασης συζητήθηκαν σε σχέση με τα πρότυπα μυογένεσης που έχουν ήδη μελετηθεί σε προηγούμενη εργασία.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση του PPAR $\gamma$  ήταν αυξημένη μέχρι και την ημέρα 25 dph, φτάνοντας το μέγιστο της έκφρασης του, από την οποία και ύστερα παρουσίασε μείωση και διατήρηση χαμηλών επιπέδων έκφρασης μέχρι και την ημέρα 60 dph. Τα γονίδια του TNF $\alpha$  και της λεπτίνης παρουσίασαν το μέγιστο της έκφρασης του την ημέρα 35 dph, ενώ διατήρησαν μετέπειτα χαμηλά επίπεδα μέχρι και την ημέρα 60 dph. Όσο αφορά στις προνύμφες των 58 dph, βρέθηκε ότι η έκφραση της λεπτίνης σε άτομα μικρότερου μεγέθους ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη σε άτομα μεγαλύτερου μεγέθους. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για το προσδιορισμό του ακριβούς βιολογικού και λειτουργικού ρόλου των τριών υπό μελέτη γονιδίων στη ανάπτυξη της τσιπούρας και για τη διελεύκανση του μηχανισμού συσχέτισης μεταξύ έκφραση λεπτίνης και σωματικού μεγέθους.

## Summary

Fatty tissue is no longer considered an inactive tissue that is only associated with energy storage but is gradually emerging as an active endocrine organ and an important mediator involved in many physiological and pathological processes in the energy metabolism of the organism. The **transcriptional factor PPAR $\gamma$  is directly related to the lipogenesis process**, making it an important factor for the differentiation of precursor adipocytes **and the consolidation of the adipocyte phenotype**. TNF $\alpha$  belongs to the group of cytokines, and in particular to lipokines, molecules secreted by the adipose tissue and having endocrine, paracrine or autocrine activity. Together with leptin, which also belongs to the lipokines group, these two molecules are actively involved in the regulation of lipid metabolism, promoting lipolysis and inhibiting the process of lipogenesis. In addition, these two molecules are components of cross-linking communication between muscle and fat, controlling and maintaining the energy homeostasis of the organism.

The present study was conducted in larvae of gilthead seabream at 5, 15, 25, 35, 45, 60 dph and examined the expression of the three genes, **PPAR $\gamma$ , TNF $\alpha$  and leptin, in the early developmental stages**. In addition, larvae of 58 dph with statistically significant difference in size (small vs large) were studied for differences in expression of the three genes and possible correlation with size.

**The results showed that expression of PPAR $\gamma$  increased up to day 25 dph**, reaching its maximum expression, from which it then decreased and maintained low expression levels up to 60 dph. The expression **of TNF $\alpha$**  and leptin peaked at 35 dph decreasing to steadily low levels thereafter. As for the larvae of 58 dph, it was found that the expression of leptin in individuals of smaller size was significantly higher than in larger individuals. Further studies are necessary to determine the exact biological and functional role of the three studied genes in the development of gilthead sea bream and to elucidate the correlation mechanism between leptin expression and body size.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.Εισαγωγή.....	7
1.1 Η τσιπούρα.....	7
1.2 Μορφολογία της Τσιπούρας.....	7
1.3 Αναπαραγωγή και Γονιμοποίηση .....	8
1.4 Στάδια ανάπτυξης στους τελεοστέους.....	11
2. Η μυϊκή ανάπτυξη στη τσιπούρα .....	16
3. Η διαδικασία της λιπογένεσης .....	19
3.1 Η λιπογένεση στους τελεοστέους.....	20
4. Οι πυρηνικοί υποδοχείς PPAR .....	22
4.1 Δομή του PPARγ.....	24
4.2 PPARγ και διαφοροποίηση των λιποκυττάρων.....	26
5. Tumor Necrosis Factor (TNF-α) και λιπιδιακός μεταβολισμός .....	28
5.1 Ρύθμιση της λιπόλυσης από τον TNF-α.....	30
5.2 Το γονίδιο του TNF-α στα ψάρια .....	33
6. Λεπτίνη(LEP) .....	34
7.Σκοπός Εργασίας .....	37
8.Υλικά και Μέθοδοι .....	38
8.1 Ψάρια και στάδια δειγματοληψίας.....	38
8.2 Απόμονωση RNA.....	38
8.3 Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων με Q-PCR .....	39
8.4 Στατιστική Ανάλυση .....	40
9. Αποτελέσματα .....	41
9.1 Έκφραση των γονιδίων στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας. ....	41
10. Συζήτηση.....	44
10.1 Η έκφραση των γονιδίων σε σχέση με τα στάδια της μυογένεσης στη τσιπούρα. ....	45
11. Συμπεράσματα .....	47
12. Βιβλιογραφία.....	49

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Η τσιπούρα

Η τσιπούρα είναι ένα υποτροπικό είδος που ανήκει στην οικογένεια των σπαροειδών και εντοπίζεται γεωγραφικά μεταξύ των συντεταγμένων  $62^{\circ}$  Β -  $15^{\circ}$  Β,  $17^{\circ}$  Δ -  $43^{\circ}$  Α (Πίνακας 1). Εμφανίζεται κατά κύριο λόγο στη Μεσόγειο και σπανιότερα στη Μαύρη Θάλασσα. Επιπλέον, εντοπίζεται και στο ανατολικό τμήμα του Ατλαντικού ωκεανού, στις Βρετανικές Νήσους, στο Στενό του Γιβραλτάρ καθώς και στα Κανάρια Νησιά (1).

Πρόκειται για ένα παράκτιο είδος, που κατοικεί σε θαλάσσια στρώματα, αμμώδεις πυθμένες καθώς και στην επιφάνεια της θάλασσας. Συχνά βρίσκεται σε βάθη έως περίπου 30m, ωστόσο τα ενήλικα άτομα μπορεί να εμφανιστούν και σε βάθος 150m. Το είδος είναι ευρύαλο και συχνά μπορεί και εισέρχεται σε υφάλμυρα νερά. Είναι κυρίως σαρκοφάγο και τρέφεται με οστρακοειδή και ψάρια, αν και δυνητικά μπορεί να γίνει φυτοφάγο (2)

*Πίνακας 1. Ταξινομική κατάταξη της τσιπούρας*

Βασίλειο	Φύλο	Υποφύλο	Τάξη	Οικογένεια	Γένος
Ζώα	Χορδωτά	Σπονδυλωτά	Ακτινοπτερύγιοι	Σπαροειδή	Sparus

### 1.2 Μορφολογία της Τσιπούρας

Η τσιπούρα χαρακτηρίζεται από ένα σώμα με ωοειδές σχήμα, πολύ υψηλά και πλευρικά συμπιεσμένο (Εικόνα 1). Το σχήμα της κεφαλής είναι καμπυλωτό με μικρούς οφθαλμούς. Τα μάγουλα καλύπτονται με λέπια ενώ το προ-ωοειδές οστό δεν διαθέτει λέπια. Στο στόμα, η κάτω γνάθος είναι μικρότερη από την άνω. Η κάθε γνάθος αποτελείται από 4-6 κυνόδοντες και από γομφίους από τους οποίους 2-4 σειρές εντοπίζονται στην άνω γνάθο ενώ 3-4 σειρές εντοπίζονται στην κάτω γνάθο.

Η τσιπούρα παρουσιάζει ως επί το πλείστον ασημί-γκρι χρώμα με μια μεγάλη μαύρη κηλίδα στην αρχή της πλευρικής γραμμής που καλύπτει το άνω μέρος του βλεφάρου. Επιπροσθέτως, εντοπίζεται μια χρυσή και μια

μαύρη ζώνη μεταξύ των οφθαλμών με τη χρυσή ζώνη να στενεύει προς το κεντρικό τμήμα του ιχθύος. Το ραχιαίο πτερύγιο χαρακτηρίζεται από μπλε-γκρι χρώμα με μια παρεμβαλλόμενη μεσαία μαύρη γραμμή ενώ το ουραίο πτερύγιο είναι γκριζωπό λευκό καταλήγοντας σε μαύρες άκρες.



*Εικόνα 1. Η τσιπούρα. (Property of International Game Fish Association)*

### 1.3 Αναπαραγωγή και Γονιμοποίηση

Η τσιπούρα είναι ένα πρώτανδρο ερμαφρόδιτο ψάρι με την αναπαραγωγική του περίοδο να κυμαίνεται από τον Οκτώβριο μέχρι τον Δεκέμβριο. Πρόκειται για ένα είδος του οποίου τα άτομα αποτελούν λειτουργικά αρσενικά για τα πρώτα δύο χρόνια ενώ σε μεγέθη άνω των 30 cm μετατρέπονται σε θηλυκά. Μετά την ωτοκία, τα αυγά, που είναι σφαιρικά και διαφανή, έχουν διάμετρο περίπου 1 mm (3). Κατά γενικό κανόνα, ένα ερμαφρόδιτο μπορεί να παράξει μόνο ένα τύπο γαμέτη, σπερματοζωάρια ή ωάρια, σε μία συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Για αυτό το λόγο, η γονιμοποίηση των γαμετών πρέπει να πραγματοποιηθεί από ένα άλλο άτομο του είδους. Η πλειοψηφία των ερμαφρόδιτων ψαριών εναλλάσσουν το φύλο τους κατά τη διάρκεια διαφορετικών αναπαραγωγικών κύκλων.



Τα περισσότερα ψάρια της κατηγορίας των τελεοστέων είναι ωτοόκα και απελευθερώνουν ώριμα ωάρια αποτελούμενα από λέκιθο σε εξωτερικά υδάτινα περιβάλλοντα όπου και πραγματοποιείται η γονιμοποίηση. Η ωοτοκία ακολουθείται από τη γονιμοποίηση και την επακόλουθη εμβρυϊκή ανάπτυξη του ζυγωτού έξω από τη μητρική σωματική κοιλότητα. Η λέκιθος του ζυγωτού είναι αυτή που παρέχει τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά για ανάπτυξη του εμβρύου στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια.

Η εξωτερική γονιμοποίηση κατά την οποία τα αυγά και τα σπερματοζωάρια απελευθερώνονται ταυτόχρονα στο εξωτερικό περιβάλλον, είναι μακράν η πιο κοινή διαδικασία γονιμοποίησης στους τελεοστέους, με περίπου το 2-3% των ατόμων αυτής της υπόταξης να προβαίνουν σε εσωτερική γονιμοποίηση. Τα περισσότερα θαλάσσια ψάρια ανεξάρτητα από τα βενθικά ή πελαγικά τους οικοσυστήματα στα οποία διαμένουν και από την κατανομή τους, παράκτια ή ωκεάνια, γεννούν αυγά τα οποία γονιμοποιούνται εξωτερικά και τα οποία επιπλέουν μεμονωμένα κοντά στην επιφάνεια. Τα αυγά αυτά κυμαίνονται από περίπου 0,6 έως 4,0 mm σε διάμετρο και παρουσιάζουν γενικά σφαιρικό σχήμα.

Κατά την είσοδο του σπερματοζωαρίου στο μη γονιμοποιημένο ωάριο, πραγματοποιούνται σημαντικές δομικές αναδιατάξεις πριν το σχηματισμό του ζυγωτού. Το ωάριο αποτελείται από μια σειρά μεμβρανών από τις οποίες η εξωτερική μεμβράνη, που ονομάζεται χορίο, είναι σχετικά παχιά και σκληρή διαθέτοντας μια μικροπύλη σε σχήμα χοάνης μέσω του οποίου το σπέρμα μπορεί να εισαχθεί και να γονιμοποιήσει το αυγό. Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, το σπερματοζωάριο των τελεοστέων δεν διαθέτει ακρόσωμα. Η γονιμοποίηση είναι συνήθως μονοσπερματική και η μικροπύλη έχει τέτοιο μέγεθος ώστε να επιτρέπεται η διέλευση μόνο ενός σπέρματος (4). Με την σύζευξη του θηλυκού και του αρσενικού γαμέτη, δραματικές αλλαγές λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια του ωοκυττάρου συμπεριλαμβανομένου της αποκόλλησης του χορίου και του σχηματισμού του περιλεκιθικού χώρου. Τα κοκκία που εντοπίζονται στο φλοιό, δηλαδή στο περιφερικό κυτταρόπλασμα εσωτερικά της μεμβράνης του ωοκυττάρου, εξωκυτταρώνουν το περιεχόμενο τους προκαλώντας την αποκόλληση του χορίου από την επιφάνεια του ωοκυττάρου.

Το περιεχόμενο των συγκεκριμένων κοκκίων αποτελείται από παράγοντες υψηλού μοριακού βάρους οι οποίοι προκαλούν αύξηση της

βαθμίδωσης της οσμωτικής πίεσης μεταξύ του χορίου και του περιλεκιθικού χώρου. Επιπλέον, η μεμβράνη του χορίου είναι διαπερατή σε μόρια νερού, μικρούς ηλεκτρολύτες και σάκχαρα. Κατά συνέπεια, το νερό καθώς και οι διαλυμένες ουσίες κινούνται μέσω διάχυσης και οσμωτικής ροής προς τον περιλεκιθικό χώρο. Ως αποτέλεσμα, αυξάνεται η υδροστατική πίεση στο εσωτερικό του περιεχομένου του περιλεκιθικού χώρου, αναγκάζοντας έτσι τη μαλακή και ελαστική μεμβράνη του χορίου να ανυψωθεί από το ωοκύτταρο και να αποκολληθεί. Λίγο μετά τη γονιμοποίηση, το ωοκύτταρο υποβάλλεται σε μια μεταμόρφωση κατά την οποία, λαμβάνει νερό, αυξάνει το βάρος του ενώ το μαλακό και χαλαρό χόριο γίνεται σκληρό και ανελαστικό αποκτώντας ανθεκτικότητα σε μηχανικές, χημικές και ενζυμικές διαταραχές που μπορεί να υποστεί.

Η σύντηξη μεταξύ των αρσενικών και των θηλυκών γαμετών πυροδοτεί και άλλες σημαντικές μεταβολές στη μορφολογία του φλοιού του γονιμοποιημένου αυγού συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού του κώνου γονιμοποίησης, του δεύτερου πολικού σωμάτιου καθώς την έναρξη της ενδοκύττωσης του σπερματοζωάρου. Η σύντηξη σπερματοζωαρίων και ωαρίων ξεκινά με την πρόσδεση και την σύντηξη των μεμβρανών των δύο γαμετών. Ως αποτέλεσμα, μια προσανατολισμένη κίνηση του κυτταροπλάσματος οδηγεί στο σχηματισμό μιας προεξοχής που ονομάζεται κώνος γονιμοποίησης ή ωοπλασμική προεξοχή. Ο σχηματισμός και ο μετασχηματισμός του κώνου διακρίνεται σε δυο στάδια που περιλαμβάνουν μια φάση ανάπτυξης και μια φάση συρρίκνωσης. Η μορφολογία, ο χρόνος σχηματισμού καθώς και το πρότυπο σχηματισμού ποικίλλει σε διαφορετικά είδη ψαριών. Με το τέλος της ανάπτυξής του κώνου γονιμοποίησης, αυτός συνήθως ατροφεί, καταρρέει και τελικά παύει να υφίσταται ως αναγνωρίσιμη δομή στην επιφάνεια του αυγού.

Όσο αφορά στο σχηματισμό των προπυρηνών, τα βασικά χαρακτηριστικά της ανάπτυξης του αρσενικού προπυρήνα παρουσιάζουν ομοιότητες με άλλους οργανισμούς. Αυτά περιλαμβάνουν τη διάσπαση και τον κατακερματισμό του πυρηνικού φακέλου που περιβάλλει το σπερματοζωάριο, τον διασκορπισμό της συμπυκνωμένης χρωματίνης του σπέρματος και την ανάπτυξη του προπυρηνικού φακέλου. Ο μετασχηματισμός του πυρήνα του γαμέτη σε αρσενικό προπυρήνα ολοκληρώνεται ουσιαστικά με το σχηματισμό του προπυρηνικού φακέλου. Η

ανάπτυξη του δεύτερου θηλυκού προπυρήνα σε αυγά των τελεοστέων είναι παρόμοια με εκείνη στα αυγά άλλων οργανισμών μετά την ενσωμάτωση του σπερματοζωαρίου. Αυτή περιλαμβάνει συνήθως το διασκορπισμό των μητρικών χρωμοσωμάτων, τη συσσώρευση κυστιδίων κατά μήκος των χρωμοσωμάτων και την προοδευτική σύντηξη της μεμβράνης αυτών των κυστιδίων για να σχηματίσουν τη διπλοστοιβάδα του προπυρηνικού φακέλου (5).

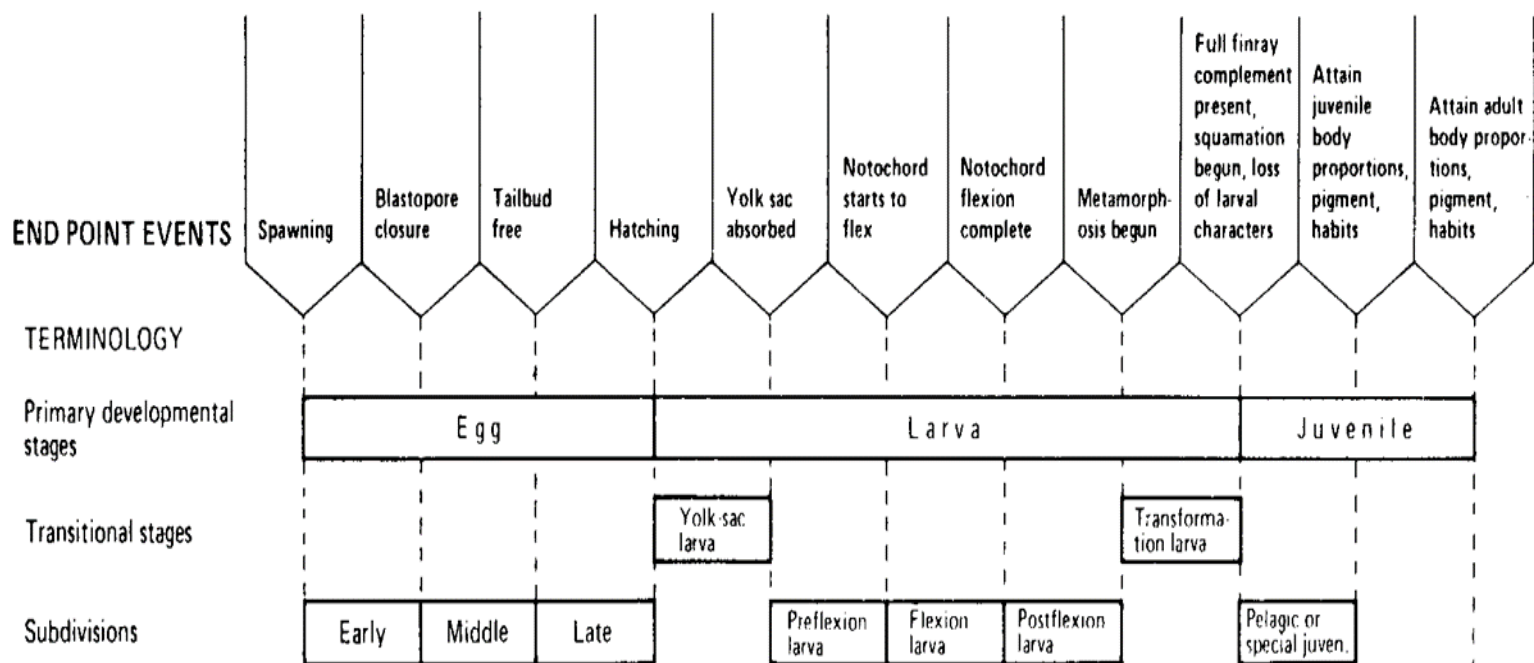
#### 1.4 Στάδια ανάπτυξης στους τελεοστέους

Συνολικά, η ανάπτυξη του οργανισμού μπορεί να διακριθεί σε τρία βασικά στάδια. Πρώτο είναι το στάδιο του αυγού που περιλαμβάνει όλη τη διαδικασία απο την γονιμοποίηση μέχρι την εκκόλαψη, δεύτερο είναι το στάδιο της προνύμφης που αφορά την περίοδο μεταξύ της εκκόλαψης και την μεταμόρφωση και τρίτο αποτελεί το στάδιο της ενηλικίωσης, δηλαδή την έναρξη της μεταμόρφωσης και το εφηβικό στάδιου του ιχθυοειδούς μέχρι την επίτευξη αναπαραγωγικής ωριμότητας ως ενήλικο άτομο.

Τα αυγά εκκολάπτονται σε σχετικά υποανάπτυκτες προνύμφες λεκιθικού σάκου που κολυμπούν ελάχιστα και βασίζονται στην λεκιθό τους για τροφή. Τα αισθητήρια, κυκλοφοριακά, μυϊκά και πεπτικά τους συστήματα εξελίσσονται έως ότου να παρέχεται η δυνατότητα να τρέφονται με πλαγκτόν. Ακόμη και αυτές οι προνύμφες λεκιθικού σάκου παρουσιάζουν χαρακτηριστές όπως πρότυπο χρωματισμού, μέγεθος σώματος, σχήμα και αριθμός μυομερών. Μετά την εξάντληση του λεκιθικού περιεχομένου, οι προνύμφες αναπτύσσουν παροδικούς χαρακτηριστές όπως πρότυπα χρωματισμού, συγκεκριμένες μορφές σπονδυλικής στήλης και δομές πτερυγίων που προσδίδουν προφανώς προσαρμοστική ικανότητα για αυτή τη χρονική περίοδο της ζωής τους. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου αναπτύσσονται σταδιακά όλο και περισσότερα χαρακτηριστικά του ενήλικου ατόμου. Στο τέλος του σταδίου της ανάπτυξης των προνυμφών, αυτές δύνανται να περάσουν μέσω μιας απότομης μεταμόρφωσης στο στάδιο της νεανικής ηλικίας, ειδικά εάν υπάρχει μετακίνηση από ένα πελαγικό σε ένα βενθικό βιότοπο αλλιώς ο μετασχηματισμός είναι βαθμιαίος.

Το αναπτυξιακό στάδιο της προνύμφης εκ τούτου παρουσιάζει και διακριτές υποκατηγορίες (Εικόνα 2):

1. Προνύμφη λεκιθικού σάκου: αφορά το διάστημα μεταξύ εκκόλαψης και εξάντλησης του λεκιθικού σάκου
2. Προνύμφη προ-κάμψης: από την εξάντληση του λεκιθικού σάκου μέχρι την ανοδική κάμψη της νωτοχορδής
3. Προνύμφη κάμψης: από την ολοκλήρωση της κάμψης της νωτοχορδής μέχρι τα πλευρικά οστά να φτάσουν στην κατακόρυφη θέση
4. Προνύμφη μετά-κάμψης: σχηματισμός του ουραίου πτερυγίου και εμφάνιση εξωτερικών μεριστικών χαρακτηριστικών όπως ακτινωτό πτερύγιο.



Εικόνα 2. Ορολογία των πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων (6)

Κατά την εκκόλαψη τα κύρια χαρακτηριστικά της προνύμφης λεκιθικού σάκου είναι η εμφανής κεφαλική δομή καθώς και ο μεγάλος λεκιθικός σάκος (Εικόνα 3). Η προνύμφη έχει περίπου μήκος 2.6 mm και αποτελείται από 21 σωμίτες (8). Δεδομένου του μεγέθους του λεκιθικού σάκου, οι προνύμφες μπορούν να βρίσκονται σε διαφορετική αναπτυξιακή κατάσταση. Οι προνύμφες από αυγά με μικρούς λεκιθικούς σάκους είναι

λιγότερο ανεπτυγμένες κατά την εκκόλαψη από εκείνες που εκκολάπτονται από αυγά με μεγαλύτερους. Η πλειοψηφία των αυγών των θαλάσσιων ψαριών είναι περίπου 1 mm σε διάμετρο και διαθέτουν ένα στενό περιλεκιθικό χώρο με τον κρόκο είναι ελαφρώς μικρότερος από 1 mm. Οι προνύμφες από τέτοια αυγά συνήθως στερούνται λειτουργικότητας του στόματος, χρωματισμού του οφθαλμού και διαφοροποιημένων πτερυγίων (6).

Ως διαδικασία σίτισης μπορεί να οριστεί η κατάποση εξωγενούς ουσίας στο στομάχι ή η ικανότητα πραγματοποίησης της και όχι οι συμπεριφορικές αντιδράσεις του ατόμου σε δυνητικά τροφικά αντικείμενα. Κατά αυτόν τον τρόπο, η σίτιση αποτελεί ανεξάρτητη διαδικασία από την ολοκλήρωση της απορρόφησης της λεκίθου. Τόσο ο ρυθμός απορρόφησης της λεκίθου όσο και η αποτελεσματικότητα της μεταβολικής αξιοποίησης της είναι σημαντικοί και καθοριστικοί παράγοντες της πρώιμης ανάπτυξης της προνύμφης για την ανάπτυξη και εν τέλει την επιβίωση της. Η επιβίωση της προνύμφης εξαρτάται επιπλέον από τη διαθεσιμότητα της τροφής σε επαρκή ποσότητα και ποιότητα μετά από την ολοκλήρωση του σταδίου εξάντλησης των αποθεμάτων της λεκίθου. Επομένως υφίστανται ισχυρές επιλεκτικές πιέσεις στο άτομο, γεγονός που καθιστά απαραίτητο τον σωστό συγχρονισμό της ολοκλήρωσης της απορρόφησης της λεκίθου και της ανάπτυξης της δυνατότητας πρόσληψης τροφής από το εξωγενές περιβάλλον. Ο ρυθμός και η αποτελεσματικότητα της απορρόφησης της λεκίθου επηρεάζονται από ένα σύνολο περιβαλλοντικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας, του φωτός, της συγκέντρωσης του οξυγόνου και της αλατότητας του ύδατος (7).

Όσο αφορά στην πρώιμη μορφολογία της κατά την εκκόλαψη, η προνύμφη είναι συνήθως διαφανής με μερικά σημεία χρωματισμού. Η νωτοχορδή και τα μυοτόμια είναι διακριτά συνοδευόμενα συνήθως με μια μικρή ανάπτυξη χόνδρων ή οστεοποίησης κατά μήκος του σκελετού. Ολοκληρωμένα σύνολα πτερυγίων σπάνια είναι παρόντα στις προνύμφες, ωστόσο το πρωταρχικό πτερύγιο είναι επαρκώς ανεπτυγμένο. Το στόμα και οι γνάθοι δεν έχουν ακόμη εμφανιστεί ενώ το έντερο είναι ένας ίσιος σωλήνας. Παρόλο που η καρδιά λειτουργεί για ένα σημαντικό χρονικό διάστημα ακόμα και πριν από την εκκόλαψη, το αίμα είναι άχρωμο ενώ τόσο το κυκλοφορικό όσο και το αναπνευστικό σύστημα είναι υποανάπτυκτα. Ο

νεφρός βρίσκεται σε προνεφρικό στάδια διαθέτοντας πολύ λιγα εσπειραμενα σωληνάκια. Ο χρωματισμός των ματιών παρουσιάζει διαφοροποιήσεις σε διαφορετικά είδη, αλλά συνήθως στις περιπτώσεις που ο οφθαλμός δεν είναι λειτουργικός μέχρι και το σημείο της εκκόλαψης, εξασφαλίζεται άμεσα η ανάπτυξη του σε σύντομο χρονικό διάστημα (9).




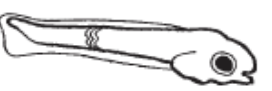
Κατά την χρονική περίοδο των πρώτων ημερών, δηλαδή στις 6-9 μέρες το εμβρυϊκό σχήμα του σώματος της προνύμφης καθώς και ο λεκιθικός σάκος αντικαθίστανται από τον σταδιακό σχηματισμό των οργάνων. Η νυστική κύστη διογκώνεται με αέρια, οι γνάθοι και το έντερο διαφοροποιούνται ενώ τα βραγχιακά νημάτια σχηματίζονται και καθίστανται λειτουργικά. Η κεφαλική περιοχή σταδιακά αναπτύσσεται και το στόμα ανοίγει. Η νωτοχορδή είναι εμφανώς αναγνωρίσιμη και τα θωρακικά πτερύγια προοδευτικά λαμβάνουν σχήμα. Σε αυτό το σημείο η προνύμφη έχει τη δυνατότητα να διατηρήσει μια οριζόντια θέση ηρεμίας αλλά και να εκτελέσει πιο ευέλικτες σωματικές κινήσεις.

Στις 15-18 ημέρες, ο λεκιθικός σάκος εξαφανίζεται πλήρως σε μέγεθος προνύμφης μεταξύ 6.5-7.2 mm που αποτελείται από 24 σωμίτες. Η ικανότητα κίνησης σταδιακά αυξάνεται ενώ τα πτερύγια ξεκινούν την ανάπτυξη τους. Τα θωρακικά, πλέον, πτερύγια είναι ιδιαίτερα εμφανή ενώ η ανάπτυξη του εντέρου σε σημείο που αυτό είναι λειτουργικό βρίσκεται σε εξέλιξη. Επιπλέον, εντοπίζεται και ικανή ανάπτυξη της σπονδυλικής στήλης. Ως αποτέλεσμα, η προνύμφη του συγκεκριμένου σταδίου έχει την δυνατότητα για μια πιο σταθερή κίνηση που μοιάζει με αυτή του χελιού και βοηθάει στην προσληψη τροφής. Στο προ-μεταμορφωτικό στάδιο των 30-45 ημερών, η ανάπτυξη είναι πολύ πιο έντονη σε επίπεδο όλων των διαφορετικών ιστών. Η προνύμφη παρουσιάζει όλα τα τυπικά χαρακτηριστικά ενός ενήλικου ατόμου από την άποψη τόσο της εξωτερικής όσο και της εσωτερικής ανατομίας. Το νευρο-μυοσκελετικό σύστημα είναι καλά ανεπτυγμένο ενώ η κινητικότητα της προνύμφης είναι ιδιαίτερα έντονη. Η πεπτική οδός διαφοροποιείται καθώς το έντερο αναδιπλώνεται και τα πεπτικά όργανα αναπτύσσονται έως ότου και να αποκατασταθεί η πλήρης λειτουργικότητα. Το οπίσθιο μέρος της νωτοχορδής σταδιακά κυρτώνει ανοδικά και ο ουριαίος λοβός γίνεται ομόκερκος. Υπάρχει συσσώρευση μεσεγχυματικού ιστού στη περιοχή των πτερυγίων με πρώτο τον εντοπισμό του στα θωρακικά πτερύγια και μετέπειτα στα κοιλιακά. Το αρχικό περίγραμμα των κοιλιακών πτερυγίων

είναι πλέον εμφανές. Σταδιακά η ανάπτυξη των λεπίων είναι εμφανής και η ανάπτυξη της σπονδυλικής στήλης διευκολύνει όλο και περισσότερο την κίνηση.

Στις 60-90 ημέρες το ιχθύδιο δεν χαρακτηρίζεται πλέον από τα τυπικά χαρακτηριστικά προνύμφης και τα λέπια καθώς και τα ακτινωτά πτερύγια είναι καλά οργανωμένα. Λόγω της αύξησης του μεγέθους του σώματος (14-20mm) η ενέργεια που απαιτείται για την κίνηση είναι πολύ αυξημένη.

Τέλος, στις 150 ημέρες (28mm) το ιχθύδιο εμφανίζει γενικά ανατομικά και κινητικά χαρακτηριστικά με το στάδιο των 60-90 ημερών, καθώς και παρόμοια χαρακτηριστικά με το ενήλικο ψάρι (8,10).

days and stages	mm length	n° somites	yolk sac	gut	alimentation	swimming	caudal fin
HATCHING 	0	2.5	21				
PRE-LARVA 	1	2.6	22	present	not open mouth	/	first attempts of darting movements
LARVA 	6	3.5	23	partially resorbed	open mouth	first attempts of feeding	active darting movements
	9	3.7	24				
	15	3.9	24		development of gut and glands in progress	active feeding	continuous eel-like swimming plus darting movements
	18	4.3	24				
	30	5.5	25				continuous effective swimming improved by swim bladder
METAMORPHOSIS 	45	8.1	not present				
				functional gut	very active feeding		

Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των κύριων αναπτυξιακών γεγονότων στην τσιπούρα (8).

## 2. Η μυϊκή ανάπτυξη στη τσιπούρα

Ο μυς αναπτύσσεται και αυξάνεται μέσα από δύο βασικές διαδικασίες, από τις οποίες η πρώτη σχετίζεται με το σχηματισμό νέων μυϊκών ινών και ονομάζεται υπερπλασία, ενώ η δεύτερη αφορά στην αύξηση του μεγέθους των υφιστάμενων ινών και ονομάζεται υπερτροφία. Οι δύο διαδικασίες ρυθμίζονται διαφορετικώς καθ 'όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής



των τελεοστέων. Συγκεκριμένα, η υπερπλαστική μυϊκή ανάπτυξη κυριαρχεί κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων ανάπτυξης, ενώ η υπερτροφία ακολουθεί μετέπειτα. Στη περίπτωση ενός τελεοστέου που διαθέτει ένα μεγάλο μέγεθος σώματος κατά την ενηλικίωση του, όπως η τσιπούρα (*Sparus aurata*), ο σχηματισμός των ινών γίνεται σε τρεις διαφορετικές φάσεις κατά τη διάρκεια της οντογένεσης. Χαρακτηριστικά, η πρώτη φάση αποτελεί την εμβρυϊκή μυογένεση που προκαλεί καταλήγει στη δημιουργία δύο διακριτών μορφολογικών και λειτουργικών τύπων μυός που απαρτίζουν το πρωτογενές μυοτόμιο. Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει τη στρωματοποιημένη υπερπλασία, κατά τη διάρκεια της οποίας οι ραχιαίες και οι κοιλιακές βλαστικές ζώνες δημιουργούν νέες λευκές μυϊκές ίνες σε διακεκριμένες διαστρωματώσεις κατά μήκος του κατακόρυφου άξονα, ενώ η τρίτη φάση είναι η μωσαϊκή υπερπλασία, στην οποία τα μυογενετικά κυττάρα (MPC) συγχωνεύονται και σχηματίζουν νέους μυοσωλήνες ή συγχωνεύονται με υπάρχουσες μυϊκές ίνες και συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση τους. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μυϊκών ινών μεταβλητής διαμέτρου που δημιουργούν το τελικό μωσαϊκό πρότυπο του μυϊκού συστήματος μιας ώριμης τσιπούρας. Η πλειοψηφία των ινών που απαρτίζουν το μωσαϊκό πρότυπο είναι ως επί το πλείστον λευκές μυϊκές ίνες. Η μωσαϊκή υπερπλασία ενεργοποιείται κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης και παραμένει ενεργή σε όλη τη διάρκεια της ζωής του ψαριού (34,35).

Η παραγωγή και η αύξηση των μυϊκών ινών απαιτεί τη σύνθεση και την εναπόθεση σαρκομερών πρωτεϊνών που απαρτίζουν το μεγαλύτερο μέρος των διαφοροποιημένων μυϊκών κυττάρων. Η μυοσίνη είναι μια σημαντική σαρκομερική πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο βαριές αλυσίδες (MHCs) και τέσσερις ελαφριές αλυσίδες (MLCs) συνδυασμένες μεταξύ τους σχηματίζοντας μια μακρία ελικοειδής δομή και δύο κεφαλές. Οι MHCs και οι MLCs υφίστανται σε πολλαπλές ισόμορφες που μπορεί να εμφανίζουν τόσο ιστοειδικό όσο και εξειδικευμένο με το αντίστοιχο στάδιο πρότυπο έκφρασης, ενώ ρυθμίζονται από την ορμονική κατάσταση του οργανισμού και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. (36).

Η διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων είναι μια σύνθετη διαδικασία που απαιτεί τη συντονισμένη δράση ορισμένων μεταγραφικών παραγόντων που ονομάζονται μυογενετικοί ρυθμιστικοί παράγοντες (MRF), η έκφραση των οποίων είναι λεπτώς ρυθμιζόμενη τόσο χρονικά όσο και

χωροταξικά. Η μεταγραφή, ο υποκυτταρικός εντοπισμός και ο χρόνος ημιζωής των μυογενετικών παραγόντων MyoD, Myf5, της μυογενίνης και του MRF4 είναι αυστηρά ρυθμιζόμενη ώστε να εξασφαλίσει τον προσδιορισμό των μυοκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και την τελική διαφοροποίηση των μυοσωλήνων (37).

Η έκφραση του γονιδίου της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης 2 στην τσιπούρα αντιπροσωπεύεται από δύο διαφορετικές ισομορφές, την MLC2a και την MLC2b. Η έκφρασή τους συσχετίζεται τόσο με υπερπλαστικές και υπερτροφικές αναπτυξιακές διαδικασίες όσο και με άλλα δομικά, ρυθμιστικά και μυογενετικά γονίδια που δρουν κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του μυός. Η έκφραση της ισομορφής MLC2a κυριαρχεί στα πρώιμα στάδια και σηματοδοτεί το σχηματισμό νέων ινών, ενώ το mlc2b ρυθμίζεται θετικά κατά την έναρξη του σταδίου της υπερτροφίας. Είναι ενδιαφέρον ότι η μυοστατίνη 1 (mstn1) φαίνεται να συσχετίζεται με την έναρξη του σταδίου της υπερτροφίας μαζί με τον παράγοντα IGF1 και πιθανόν αυτοί λειτουργούν ως μοριακοί ενεργοποιητές της έκφρασης των δομικών παραγόντων MLC2a, MLC2b και COLLa1 στο στάδιο της μωσαϊκής υπερπλασίας μετά τη μεταμόρφωση.

Η επικρατούσα ισομορφή του MLC2 κατά τη διάρκεια της στρωματοποιημένης υπερπλασίας είναι η MLC2a και η έκφρασή της φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά μεταξύ των 25 και 35 dph. Μετά τις 35 dph, όταν οι ραχιαίες και οι κοιλιακές βλαστικές ζώνες παρουσιάζουν κάποιο αριθμό ινών μικρής διαμέτρου, η ισομορφή MLC2a μειώνεται στην έκφραση της σε σχέση με τα προηγούμενα αναπτυξιακά στάδια, αλλά αυξάνεται σημαντικά και πάλι στις 60 dph κατά την έναρξη της μωσαϊκής υπερπλασίας. Η ισομορφή MLC2b παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα κατά την πρώιμη υπερπλαστική ανάπτυξη (5-25 dph), ωστόσο ρυθμίζεται σημαντικώς θετικά κατά την διάρκεια της υπερτροφίας. Μια παροδική μείωση της ρύθμισης της έκφρασης της MLC2b εμφανίζεται στις 45 dph πριν την κορυφή της στις 60 dph, όπου και πραγματοποιείται η έναρξη της μωσαϊκής υπερπλασίας. Η έκφραση της αλυσίδας του κολλαγόνου COLLa1 παρουσιάζει παράλληλα και όμοια επίπεδα με αυτά του MLC2b με στόχο την υποστήριξη της υπερτροφικής ανάπτυξης που υφίσταται η μυϊκή μάζα. Χαρακτηριστικά, μέχρι και την ημέρα 29 dph, η έκφραση της ήταν χαμηλή και αυξήθηκε σημαντικά μεταξύ του διαστήματος 29-37 dph (31).

### 3. Η διαδικασία της λιπογένεσης

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί, πιθανώς λόγω περιορισμού της διαθεσιμότητας των πόρων για επιβίωση, είναι προγραμματισμένοι να προβαίνουν στην διατήρηση διαθέσιμων πόρων. Όλα τα είδη, από τον *C. elegans* μέχρι τον *Homo sapiens*, διαθέτουν την ικανότητα να αποθηκεύουν την υπερβολική μη απαιτούμενη ενέργεια με τη μορφή λίπους για μελλοντικές ανάγκες. Η αποθήκευση λίπους πραγματοποιείται μέσω ενός μεσοδερματικού ιστού που ονομάζεται λευκός λιπώδης ιστός (WAT). Η κατανομή αυτών των λιπωδών ιστών ποικίλλει μεταξύ των ειδών. Για τα ασπόνδυλα, τα αμφίβια και πολλά ερπετά, τα μεγαλύτερα αποθέματα λίπους εντοπίζονται ενδοκοιλιακά. Στις φώκιες και τις φάλαινες, η πλειοψηφία του λίπους βρίσκεται υποδόρια, ενώ τα θηλαστικά και τα πτηνά παρουσιάζουν τόσο ενδοκοιλιακή όσο και υποδόρια κατανομή του λίπους τους.

Ο λιπώδης ιστός απαρτίζεται κυρίως από λευκά λιποκύτταρα (WAT), τα οποία αποτελούν πρωταρχική θέση αποθήκευσης τριγλυκεριδίων και των ενεργειακών αποθεμάτων, και τα φαιά λιποκύτταρα (BAT), τα οποία είναι σημαντικά για τη βασική αλλά και επαγωγίμη δαπάνη ενέργειας με τη μορφή θερμογένεσης. Στα ψάρια απαντάται μόνο λευκός λιπώδης ιστός.

Τα λευκά λιποκύτταρα παρουσιάζουν σφαιρικό σχήμα και αποτελούνται από ένα ενιαίο λιπιδικού σταγονιδίου, που περιβάλλεται από μια μειωμένη περιοχή κυτταροπλάσματος και το οποίο ουσιαστικά καταλαμβάνει την πλειοψηφία του όγκου του λιποκυττάρου. Ως εκ τούτου μορφολογικά, ο πυρήνας και όλα τα οργανίδια ωθούνται προς την περιφέρεια του κυττάρου. Τα λευκά λιποκύτταρα είναι τα μόνα κύτταρα που μπορεί να ποικίλλουν δραματικά σε μέγεθος (από 10μm έως 180μm διάμετρος) υπό διαφορετικές παθολογικές / φυσιολογικές συνθήκες λόγω διαφορετικής συσσώρευσης λιπιδίων.

Η συσσώρευση λίπους καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ σύνθεσης λίπους (λιπογένεση) και διάσπαση λίπους (λιπόλυση- οξείδωση λιπαρών οξέων). Η λιπογένεση περιλαμβάνει τις διαδικασίες σύνθεσης λιπαρών οξέων και την επακόλουθη σύνθεση τριγλυκεριδίων που λαμβάνει χώρα τόσο στο ήπαρ όσο και στον λιπώδη ιστό. Η διαφοροποίηση των

λιποκυττάρων αποτελεί μια διαφορετική διαδικασία, η οποία σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των πρώιμων λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα. (12)

Η διαδικασία της τερματικής διαφοροποίησης των λιποκυττάρων από πρώιμα λιποκύτταρα που ωριμάζουν σε διαφοροποιημένα λιποκύτταρα περιλαμβάνει 4 στάδια. Συγκεκριμένα, αυτά είναι η αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, η κλωνική επέκταση, η πρόωρη διαφοροποίηση και η τελική διαφοροποίηση. Τα στάδια αυτά πραγματοποιούνται μέσω ενός καταρράκτη μεταγραφικών αλληλεπιδράσεων που περιλαμβάνει την πυρηνικό υποδοχέα PPAR $\gamma$  καθώς και μέλη της οικογένειας C / EBP. Ο PPAR $\gamma$  διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην λιπογένεση και έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητος και επαρκής για την επίτευξη της. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητος για την διαδικασία της διαφοροποίησης.

Παρόλο που μπορεί να συμβεί μερική συσσώρευση λιπιδίων σε πολλά είδη κυτταρικών τύπων συμπεριλαμβανομένων μακροφάγων, ηπατοκυττάρων και μυϊκών κυττάρων, τα λιποκύτταρα είναι διαφορετικά μορφολογικά σε σύγκριση με άλλα κύτταρα λόγω της παρουσίας μεγάλων σταγονιδίων λιπιδίων που περιβάλλονται από μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη που ονομάζεται περιλιπίνη. Συνήθως τα λευκά λιποκύτταρα περιλαμβάνουν ένα και μοναδικό λιποσταγονίδιο. Όριμα λιποκύτταρα στο λευκό λιπώδη ιστό και στο φαιό λιπώδη ιστό χαρακτηρίζονται επίσης από την παρουσία PPAR $\gamma$ 2, δείκτη της τελικής διαφοροποίησης όπως ο μεταφορέας γλυκόζης Glut4 και η συνθάση λιπαρών οξέων, η ινσουλινο-εξαρτώμενη πρόσληψη γλυκόζης και ο μεταβολισμός της. Επιπλέον, τα λευκά λιποκύτταρα χαρακτηρίζονται από την παρουσία λεπτίνης.

### 3.1 Η λιπογένεση στους τελεοστέους

Ο λευκός λιπώδης ιστός απουσιάζει από τα έμβρυα του zebrafish. Οι εναποθέσεις του λευκού λιπώδους ιστού δεν αναπτύσσονται ταυτόχρονα και πιθανόν η λιπογένεση σε διαφορετικές ανατομικές θέσεις να ρυθμίζεται διαφορετικά. Το zebrafish δεν σχηματίζει λιποκύτταρα μέχρι να φτάσει σε προνυμφικό στάδιο και οι εναποθέσεις λευκού λιπώδους ιστού εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Σε άλλα ψάρια, οι εναποθέσεις αυτές σχηματίζονται όταν το ψάρι υπερβεί ένα συγκεκριμένο μέγεθος. Στη περίπτωση των ψαριών, ο WAT περιλαμβάνει και το χαλαρό συνδετικό ιστό

στήριξης στο οποίο έχει διεισδύσει και το αγγειακό σύστημα του οργανισμού (14).

Ο λιπώδης ιστός των ψαριών αποτελείται από λιποκύτταρα με μεγάλη ποικιλία διαμέτρων. Η παρουσία τόσων μικρών όσο και μεγάλων λιποκυττάρων υποδηλώνει υπερπλαστική και υπερτροφική ανάπτυξη. Μετρήσεις μεγέθους κυψελών σε διαφορετικούς λιπώδεις ιστούς επιδεικνύουν διαφορετική πλαστικότητα από απόκριση σε συνθήκες εκτροφής όπως η διατροφή και η θερμοκρασία του νερού.

Τα λιπίδια που υπάρχουν στη σάρκα των ψαριών και στις μη καταναλωμένες εναποθέσεις λίπους διακρίνονται σε ουδέτερα και πολικά λιπίδια. Τα πρώτα εμπλέκονται στην αποθήκευση ενέργειας ενώ τα τελευταία (φωσfolιπίδια) θεωρούνται δομικά λιπίδια και αποτελούν τα κύρια συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Τα ουδέτερα λιπίδια αποτελούνται από χοληστερόλη, κυρίως τριγλυκερίδια που χαρακτηρίζονται από υψηλή ποσότητα πολυακόρεστων λιπαρών με μακριές αλυσίδες ν-3 οξέα(ωμέγα 3). Τα πολικά λιπίδια χαρακτηρίζονται από σχετικά σταθερή περιεκτικότητα και σύνθεση λιπαρών οξέων.

Η εναπόθεση του λίπους γίνεται σε κύριες ανατομικές θέσεις, γεγονός όμως που εξαρτάται από το είδος του ψαριού. Στην περίπτωση των σπαροειδών (*Sparidae*), οι εναποθέσεις πραγματοποιούνται κυρίως στο μυϊκό και σπλαχνικό λίπος.

Η εποχιακή διακύμανση που αφορά την εναπόθεση λιπιδίων στη σάρκα και σε διαφορετικές αποθήκες λίπους παρέχει γενικές πληροφορίες σχετικά με τη μεταβολική (ενεργητική) κατάσταση του ψαριού και αντανakλά το αποτελέσμα διαφόρων εξωγενών παραγόντων όπως η θερμοκρασία, η αλατότητα, η ποιότητα του νερού, η φωτοπερίοδος καθώς και η διαθεσιμότητα, η ποσότητα, η σύνθεση και η πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών της τροφής. Επιπλέον, αντανakλά και την επίδραση ενδογενών παραγόντων όπως ο γονότυπος καθώς και εμπλεκόμενων ορμονικών παραγόντων που σχετίζονται με μηχανισμούς ανάπτυξης και αναπαραγωγής. Τόσο οι πρώτοι όσο και οι τελευταίοι επηρεάζουν τη διατροφική συμπεριφορά και τη διαδικασία πρόσληψη τροφής, οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν την αναπύξη και την λιπογένεση στα ψάρια. (15)

Όπως συμβαίνει και κατά ομολογία στα θηλαστικά, τα ενήλικα άτομα των τελεοστέων αποθηκεύουν ουδέτερα λιπίδια με τη μορφή

τριάκυλγλυκερόλης. Τα αποθέματα αυτά αξιοποιούνται κατά τη διάρκεια περιόδων απουσίας θρεπτικών ουσιών. Ο μηχανισμός εναπόθεσης λίπους είναι επίσης ευαίσθητος στη διαθεσιμότητα των κάθε συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών, ενώ ο ενζυματικός μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την εναπόθεση λίπους και την κινητοποίηση των αποθεμάτων λίπους φαίνεται να παρουσιάζει ομολογία με εκείνον των θηλαστικών. Καλλιεργημένα λιποκύτταρα ψαριού εκφράζουν γονίδια που είναι ομόλογα σε δείκτες λιποκυττάρων των θηλαστικών όπως ο πυρηνικός υποδοχέας Peroxisome proliferator-activated receptor (PPaR), οι πρωτεΐνες σύνδεσης CCAAT/enhancer binding protein, η λιποπρωτεϊνική λιπάση (lpl) και η λεπτίνη, ενώ ανταποκρίνονται επίσης και σε πολλά από τα ίδια ενδοκρινικά σήματα που εμφανίζονται στα θηλαστικά λιποκύτταρα όπως η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη.

Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της λιπογένεσης στο zebrafish είναι ο αρχικός σχηματισμός λιποκυττάρων εντός του παγκρέατος στις πρώτες μέρες ανάπτυξης της προνύμφης. Παρόμοια παγκρεατική εναπόθεση έχει παρατηρηθεί κατά την οντογένεση και σε άλλα είδη τελεοστέων, ωστόσο οι μηχανισμοί που απαρτίζουν το συγκεκριμένο πρότυπο ανάπτυξης παραμένουν άγνωστοι. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι ένα τοπικό σήμα που παράγεται στο πάγκρεας είναι ικανό να επάγει τα λιποκύτταρα σε διαφοροποίηση. Για παράδειγμα, η ινσουλίνη είναι γνωστό ότι αποτελεί ισχυρό προ-λιπογονικό παράγοντα στα ψάρια καθώς και στα θηλαστικά. Συνεπώς, υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις ινσουλίνης γύρω από το πάγκρεας κατά τη διάρκεια των πρώτων προνυμφικών σταδίων μπορεί ενδεχομένως να προάγει την διαφοροποίηση σε κοντινά πρόδρομα κύτταρα. Μια δεύτερη πιθανότητα είναι ότι τα πρόδρομα κύτταρα των λιποκυττάρων που βρίσκονται είτε στο είτε γύρω από το πάγκρεας μπορεί να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε ένα συστηματικό σήμα διαφοροποίησης παρόν στην περιοχή.

(14)

#### 4. Οι πυρηνικοί υποδοχείς PPAR

Οι peroxisome proliferator-activated receptors (PPaRs) είναι μια ομάδα πρωτεϊνικών πυρηνικών υποδοχέων που λειτουργούν ως

μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων. Οι PPARs ετεροδιμερίζονται με τον ρετινοϊκό υποδοχέα X (RXR) και επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων μετά τη πρόσδεση τους σε στοιχεία απόκρισης που ονομάζονται PPREs (Peroxisome Proliferator Response Elements) που αποτελούνται από μια επανάληψη της αλληλουχίας αναγνώρισης του DNA με μοτίβο PuGGTCA σε απόσταση ενός νουκλεοτιδίου. (DR-1). Οι τρεις τύποι των συγκεκριμένων πυρηνικών υποδοχέων διακρίνονται στον α, στο β(ή δ) και στον γ τύπο υποδοχέων.

Αυτοί οι πυρηνικοί υποδοχείς επάγουν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξυσωμάτων, διαδικασία η οποία αποτελεί μια πλειοτροπική κυτταρική απόκριση σε μια σειρά χημικών ενώσεων όπως φιμπράτες, φθαλικό οξύ, ζιζανιοκτόνα, ανταγωνιστές λευκοτριενίων, συγκεκριμένα φυσικά και τροποποιημένα λιπαρά οξέα καθώς και ακετυλοσαλικυλικό οξύ. Διαταραχές σε αυτήν την διαδικασία υφίστανται και σε ορισμένες παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Ως αποτέλεσμα αυτής της επαγωγής, πραγματοποιούνται δραστικές αλλαγές τόσο στη κυτταρική μορφολογία όσο και στη κυτταρική δραστηριότητα. Κατά την ενεργοποίηση από λιπαρά οξέα (FAs), οι PPARs ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στον ενδοκυτταρικό αλλά και στον εξωκυτταρικό μεταβολισμό των λιπιδίων, κυρίως όμως εκείνων που εμπλέκονται στην υπεροξεισωματική εξουδετέρωση. (16)

Οι Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) συμμετέχουν σε πολλές διαδικασίες που σχετίζονται με την οντογένεση, όπως ο σχηματισμός και η διαφοροποίηση του σκελετικού συστήματος, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση επιθηλιακών κυττάρων, ο μεταβολισμός λιπιδίων και η ρύθμιση του, η μεταφορά λιπιδίων, η οξειδωση λιπιδίων και γλυκόζης, η λιπογένεση, η λιπιδιακή ομοιόσταση, η υπεροξυσωματική βιογένεση καθώς και ορισμένες ανοσολογικές λειτουργίες. Τα PUFA(Polyunsaturated fatty acids), τα οξειδωμένα PUFA, δηλαδή τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και τα εικοσανοειδή αποτελούν προσδέτες όλων των PPAR ισομορφών σε θηλαστικά αλλά και αμφίβια. Με αυτό το τρόπο οι συγκεκριμένοι υποδοχείς λειτουργούν ως μεταγραφικοί αισθητήρες της παρουσίας διαφόρων λιπαρών οξέων.(FA). Οι τρεις υποκατηγορίες των PPAR παρουσιάζουν διακριτή αλλά και αλληλεπικαλυπτόμενη έκφραση και σύνολο λειτουργιών.

Είναι αβέβαιο αν το ρεπερτόριο των γονιδίων-στόχων των PPaRs στους τελεοστέους είναι παρόμοιο με εκείνο των θηλαστικών. Χημικές ενώσεις οι οποίες επάγουν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων σε τρωκτικά, όπως φιβράτες, αλογονωμένοι υδρογονάνθρακες πλαστικοποιητές, ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα, μπορεί να έχουν μικρή ή καθόλου επίδραση σε άλλα είδη λόγω διαφορών στη σχετική έκφραση του PPaRa. Επιπλέον, οι συγγένειες του κάθε προσδέτη στον εκάστοτε υποδοχέα μπορεί να ποικίλουν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων ειδών και ισότυπων PPaR, κυρίως λόγω διαφορών στην επικράτεια πρόσδεσης του προσδέτη. Στα θηλαστικά, οι PPaRs αποτελούνται από τρεις ισότυπους, PPaRa, β, και γ, ενώ στους τελεοστέους υπάρχει επιπλέον ένα γονίδιο PPaRa το οποίο οφείλεται στο διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος που αυτό υπέστη κατά τη διάρκεια της εξελικτικής πορείας. (17)

Η παρουσία πέντε γονιδίων PPaR στο γονιδίωμα του zebrafish έχει περιγραφεί προηγουμένως, γεγονός που οφείλεται στο ότι το γονιδίωμα του έχει υποστεί πλήρη διπλασιασμό μετά την απόκλιση του από το κοινό πρόγονο μεταξύ των ψαριών και των θηλαστικών. Εξαιτίας αυτού, το zebrafish διαθέτει δύο γονίδια PPaRa (PPaRaα, PPaRaβ) και PPaRδ (PPaRδα, PPaRδβ) που εντοπίζονται σε ξεχωριστά χρωμοσώματα. Μόνο ένα γονίδιο PPaRγ, ωστόσο, έχει ταυτοποιηθεί στο zebrafish. Όλα οι PPaRs του zebrafish παρουσιάζουν πρωτεϊνικές ομοιότητες με τους ορθολόγους υποδοχείς των ανθρώπων και των ποντικών, με την ομοιότητα του ανθρώπινου PPaRa στο zebrafish PPaRaβ και PPaRaα να είναι 74% και 67%, αντίστοιχα. Τα γονίδια του zebrafish PPaRδα και PPaRδβ διαθέτουν 71% και 73% ομοιότητα με το ανθρώπινο PPaRδ, ενώ το γονίδιο PPaRγ στο zebrafish είναι 67% παρόμοιο με το ανθρώπινο PPaRγ. (18)

#### 4.1 Δομή του PPaRγ

Ο πυρηνικός υποδοχέας PPaRγ εμπλέκεται στη διαμεσολάβηση της έκφρασης των γονιδίων εξειδίκευσης των λιποκυττάρων και στην ενεργοποίηση της διαδικασίας διαφοροποίησης των λιποκυττάρων. (19) Στα θηλαστικά, ο υποδοχέας PPaRγ υπάρχει ως δύο ισομορφές, γ1 και γ2, οι οποίες προέρχονται από ένα μόνο γονίδιο και μεταγράφονται από διαφορετικούς υποκινητές. Η ισομορφή PPaRγ2 περιέχει επιπλέον 30



αμινοξέα στο N-τερματικό άκρο από το PPAR $\gamma$ 1 και είναι ειδικό για τη παρουσία στο λευκά λιποκύτταρα, ενώ η ισομορφή PPAR $\gamma$ 1 μπορεί να εκφραστεί σε χαμηλά επίπεδα και σε ιστούς εκτός του λευκού λιπώδους ιστού. Και οι δύο ισομορφές  $\gamma$ 1 και  $\gamma$ 2 μπορούν να επάγουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται και με τη διαδικασία της λιπογένεσης, ωστόσο ο PPAR $\gamma$ 2 παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερη λιπογονική ικανότητα.

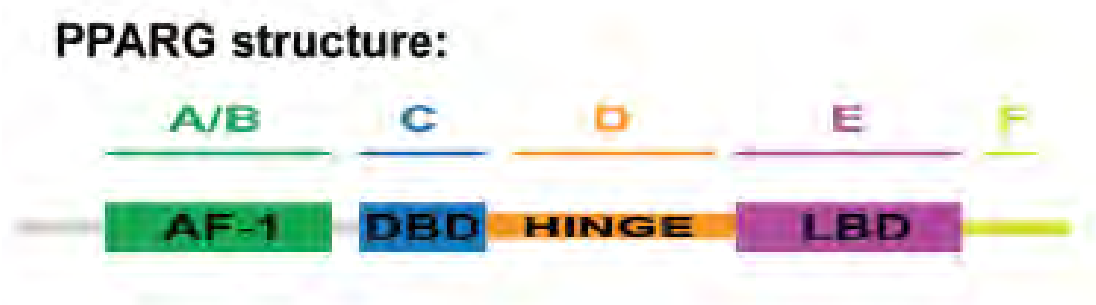
Δομικά, ο PPAR $\gamma$  αποτελείται από έξι πρωτεϊνικές επικράτειες (A-F). Το αμινοτελικό άκρο περιέχει την A/B προσδετο-ανεξάρτητη επικράτεια διαθέτοντας λειτουργία trans-activation (AF-1). Η καρβοξυτελική επικράτεια παρουσιάζει υψηλή συντήρηση, προσδένεται στο DNA (DNA-binding domain – DBD) και αποτελείται από δύο δακτυλίους ψευδαργύρου τύπου II. Η επικράτεια D αποτελείται από μια ευέλικτη hinge region, ενώ η επικράτεια E περιέχει την προσδετο-εξαρτώμενη επικράτεια AF-2 (ligand-binding domain – LBD). Τέλος, στο καρβοξυτελικό άκρο εντοπίζεται και μια μικρή επικράτεια F που φαίνεται να αλληλεπιδρά με συμπαράγοντες.

Η επικράτεια του αμινο-τελικού άκρου AF-1 ρυθμίζει την μεταγραφική δραστηριότητα του PPAR $\gamma$  με ένα σύνολο μηχανισμών. Συγκεκριμένα, επηρεάζει την ουμπικουιτιλίωση του υποδοχέα, ελέγχει τον κυτταρικό εντοπισμό του υποδοχέα σε ξεχωριστά κυτταρικά διαμερίσματα, διευκολύνει την επικοινωνία με την LBD επικράτεια ενισχύοντας την προσδετο-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση και είναι υπεύθυνη για την στρατολόγηση συμπαραγόντων και συγκαταστολέων. Κατά πλειοψηφία, οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί της επικράτειας AF-1 έχουν μετα-μεταγραφική δράση και δύναται να είναι είτε προσδετο-εξαρτώμενοι είτε προσδετο-ανεξάρτητοι. Αναστολή της φωσφορυλίωσης της σερίνης 112 (S112) στον PPAR $\gamma$  σε ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη όταν υπάρχει πρόσληψη τροφής με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Επιπλέον, οι άνθρωποι που φέρουν μετάλλαξη που εμποδίζει τη φωσφορυλίωση ενός ισοδύναμου υπολείμματος σερίνης παρουσιάζουν επίσης βελτιωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη.

Το zebrafish διαθέτει λιπώδη ιστό που είναι μορφολογικά παρόμοιος με τον αντίστοιχο WAT των θηλαστικών και ο οποίος εναποτίθεται σε ανατομικά ομόλογες περιοχές των περιοχών WAT των θηλαστικών. Επιπροσθέτως, ο λιπώδης ιστός του zebrafish ανταποκρίνεται στη μεταβολή της θρεπτικής αξίας που μπορεί να έχει η εκάστοτε τροφή, υποδηλώνοντας

ένα διατηρημένο ρόλο του λευκού λιπώδους ιστού ως αποθήκη ενέργειας κατά τη διάρκεια περιόδων ύπαρξης αυξημένης διαθεσιμότητας τροφής με υψηλή θερμιδική αξία ή αντίστοιχα μειωμένης διαθεσιμότητας. Τα zebrafish διαθέτουν ένα μόνο ορθόλογο PPaRγ στο χρωμόσωμα 11, το οποίο παρουσιάζει συνολική ομοιότητα 67% με το γονίδιο PpaRγ του ανθρώπου.

Η επικράτειες LBD και DBD του zebrafish παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλή συντήρηση σε σύγκριση με εκείνες του ανθρώπινου PPARγ. Συγκεκριμένα, το 80,5% και το 94,3% των αμινοξέων είναι ταυτόσημα στις LDB και DBD αντίστοιχα. Η περιοχή AF-1 του αμινοτελικού άκρου παρουσιάζει πολύ λιγότερο συντήρηση μεταξύ του zebrafish και του ανθρώπου. Ωστόσο, αυτό δεν αποτελεί έκπληξη καθώς είναι γνωστό ότι η περιοχή AF-1 παρουσιάζει μικρή ομοιότητα ακόμη και μεταξύ πιο στενών συγγενικών ειδών. Ο υποδοχέας PPaRγ του zebrafish περιέχει πολλαπλές περιοχές με ενθέσεις αμινοξέων που δεν υπάρχουν στον PPaRγ των θηλαστικών, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανότητα εμφάνισης νέων λειτουργιών στον πυρηνικό υποδοχέα των ψαριών. Επίσης, είναι γεγονός ότι το mRNA του PPaRγ είναι ανιχνεύσιμο σε λιποκύτταρα του zebrafish. (20)



*Εικόνα 4. Η δομή της πρωτεΐνης PPaRγ (20)*

#### 4.2 PPaRγ και διαφοροποίηση των λιποκυττάρων

Ο PPaRγ2 είναι η κυρίαρχη ισομορφή PPaR που εκφράζεται στο λίπος. Η έκφραση του PPaRγ2 επάγεται νωρίς κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων και εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα στον διαφοροποιημένο λιπώδη ιστό. Ο PPaRγ2, όπως και άλλα μέλη της οικογένειας PPAR, μπορεί να ενεργοποιηθεί *in vitro* με παροδική διαμόλυνση από διάφορες ομάδες λιπιδίων και ενώσεων που μοιάζουν με λιπίδια συμπεριλαμβανομένου των συνθετικών ανάλογων του αραχιδονικού οξέος

5,8,11,14-εικοσατετρανοϊκό οξύ (ΕΤΥΑ), του κλοφιμπρικού οξέος καθώς και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το λινελαϊκό οξύ. Η ιστο-ειδικότητα της έκφρασης του PPAR $\gamma$ 2, η επαγωγή του κατά τα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων καθώς και η ικανότητα του να ενεργοποιεί τουλάχιστον δύο ενισχυτές ειδικούς για τα λιποκύτταρα αποτελούν δεδομένα που προτείνουν ότι ο PPAR $\gamma$ 2 διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων.

Οι ισομορφές PPAR $\gamma$ 1 και PPAR $\gamma$ 2 προέρχονται από το ίδιο γονίδιο μέσω εναλλακτικού ματίσματος και χρήση διαφορετικού υποκινητή και εκφράζονται παρουσιάζοντας ιστο-ειδικότητα. Η ισομορφή PPAR $\gamma$ 2 είναι η κυρίαρχη μορφή που εκφράζεται στο λίπος, ενώ η ισομορφή PPAR $\gamma$ 1 είναι αυτή που εκφράζεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα mRNA της  $\gamma$ 1 και  $\gamma$ 2 ισομορφής διαφέρουν μόνο στα 30 αμινοτελικά αμινοξέα τους. Για ορισμένα μέλη της υπεροικογένειας αυτών των πυρηνικών υποδοχέων η αμινοτελική επικράτεια έχει βρεθεί ότι είναι σημαντική για τη μεταγραφική ενεργοποίηση, ενώ για άλλους έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει την εξειδίκευση πρόσδεσης στο DNA. (21)

Το πρώτο στάδιο της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων, και κατά πλειοψηφία στις περισσότερες κυτταρικές σειρές, είναι η αναστολή της ανάπτυξης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με την έκφραση των πυρηνικών υποδοχέων (PPAR) και των πρωτεϊνών σύνδεσης CCAAT (C/EBP). Η επαγωγή αυτών των δύο πρωτεϊνών χαρακτηρίζεται και από ένα δεύτερο βήμα αναστολής της ανάπτυξης, ακολουθούμενο από την έκφραση του πλήρως διαφοροποιημένου φαινότυπο μετέπειτα. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα PPAR συσχετίζεται με την απώλεια της ικανότητας δέσμευσης στο DNA του E2F / DP, ενός κεντρικού μεταγραφικού παράγοντα που εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό. Η μετάβαση από τα διαιρούμενα προ-λιποκύτταρα σε κύτταρα των οποίων έχει ανασταλεί ο πολλαπλασιασμός και έπειτα σε πλήρως διαφοροποιημένα λιποκύτταρα έχει συσχετιστεί με μεταβολές στην έκφραση πολλών πρωτεϊνών όπως αναστολέων κινάσης εξαρτώμενων από κυκλίνη, συμπεριλαμβανομένων των p18 (INK4a), p21 (Waf1 / Cip1) και πιθανώς της p27.

Μετά το στάδιο της κλωνικής επέκτασης, οι προ-λιποκυτταρικές σειρές εισέρχονται σε μια δεύτερη και τελική περίοδο διακοπής της

ανάπτυξης, η οποία ακολουθείται από τη διαφοροποίηση στον φαινότυπο του ώριμου λιπώδους ιστού. Η συσσώρευση mRNA των διαφόρων κυτταρικών δεικτών αντανάκλα και το ρυθμό έναρξη της μεταγραφής αλλά και το χρόνο ημιζωής αυτών μηνυμάτων.

Με την ολοκλήρωση των πρώτων συμβάντων της διαφοροποίησης, ακολουθείται μια αυξημένη συσσώρευση των κεντρικών μεταγραφικών ρυθμιστών της λιπογένεσης, δηλαδή του PPAR και του C / EBP\_. Στη συνέχεια ακολουθείται η de novo έκφραση των περισσότερων ή όλων των γονιδίων που χαρακτηρίζουν το λιποκυτταρικό φαινότυπο, μαζί με τη διαδικασία μαζικής συσσώρευσης τριγλυκεριδίων. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων περιλαμβάνουν ένζυμα και πρωτεΐνες όπως η γλυκεροφωσφορική αφυδρογονάση, η συνθάση λιπαρών οξέων, η καρβοξυλάση του ακετυλο-συνένζυμου A, τα ένζυμα του μηλικού οξέος, ο μεταφορέας γλυκόζης Glut 4, ο υποδοχέας ινσουλίνης και η aP2 (η ειδική για τα λιποκυττάρια πρωτεΐνη σύνδεσης λιπαρών οξέων). Οι δύο εκκρινόμενοι παράγοντες των λιποκυττάρων που διαδραματίζουν σαφή ρυθμιστικό ρόλο στη συστηματική φυσιολογία του οργανισμού είναι ο TNFα και η λεπτίνη, σηματοδοτικές πρωτεΐνες που παράγονται πλέον από τα πλήρως διαφοροποιημένα λιποκύτταρα. (22)

## 5. Tumor Necrosis Factor (TNF-α) και λιπιδιακός μεταβολισμός

Ο λιπώδης ιστός συμμετέχει ενεργά στην ενεργειακή ρύθμιση μέσω ενός δικτύου ενδοκρινών, παρακρινών και αυτοκρινών σημάτων. Επιπλέον, εκκρίνει έναν μεγάλο αριθμό άλλων σηματοδοτικών μορίων. Κυτοκίνες όπως η λεπτίνη, ο TNFα και η IL-6 αποτελούν συστατικά αυτής της εναλλακτικής οδού ρύθμισης των ενεργειακών αποθεμάτων συμμετέχοντας στην κινητικοποίηση και καύση τους καθώς και στην συνολικότερη ομοιοστάση της ενέργειας. Εκτός από την ρύθμιση του μεταβολισμού των ενεργειακών αποθεμάτων, ο λιπώδης ιστός επίσης συμμετέχει στη μετατροπή στεροειδών αλλά και στη σεξουαλική ωρίμανση. Με αυτόν τον τρόπο, ο λιπώδης ιστός μπορεί να θεωρηθεί ένα ενεργά ενδοκρινικό όργανο, ο οποίος δραστηριοποιείται σε πολλές πτυχές του μεταβολισμού της ενέργειας μέσω ενός δικτύου τοπικών αλλά και συστηματικών σημάτων, τα οποία

αλληλεπιδρούν με τους καθιερωμένους νευροενδοκρινείς ρυθμιστές του λιπώδους ιστού. (23)

Ο TNF-α είναι μια κυτοκίνη που εμπλέκεται στη συστηματική φλεγμονή και τη ρύθμιση των ανοσοκυττάρων. Παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα σε μεμβρανική ή εκκρινόμενη μορφή. Ο TNFα συντίθεται ως διαμεμβρανική προ-ορμόνη των 26 kDa, η οποία υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση για να δώσει ένα διαλυτό μόριο TNFα των 17 kDa. Παρά τις διαφορές στο μέγεθος και στη θέση των δύο μορφών, οι TNFα είναι ικανοί να διαμεσολαβούν και οι δύο σε βιολογικές αποκρίσεις συμμετέχοντας τόσο σε τοπικές όσο και συστημικές δράσεις αυτής της κυτοκίνης. Συγκεκριμένα, οι περισσότερες κυτταρικές αποκρίσεις, αν όχι όλες, του TNFα έχουν αποδοθεί στη δράση δύο ξεχωριστών υποδοχέων, στον τύπο 1 (TNFR1), ένα πεπτίδιο 55 ή 60 kDa στα τρωκτικά και στον άνθρωπο αντίστοιχα, και στον τύπο 2 (TNFR2), 75 ή 80 kDa σε τρωκτικά και ανθρώπους, αντίστοιχα.

Και οι δύο αυτοί υποδοχείς εκφράζονται παντού όντας παρόντες σε διαφορετικές αναλογίες και ολιγομερίζονται κατά την πρόσδεση του συνδέτη. Οι εξωκυτταρικές επικράτειες αυτών των δύο υποδοχέων εμφανίζουν ορισμένες ομόλογες αλληλουχίες, ενώ οι ενδοκυτταρικές τους επικράτειες παρουσιάζουν αρκετές διαφορές. Οι τελευταίες αποτελούν ένδειξη ότι μπορεί να σηματοδοτούν διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής επιδεικνύουν το γεγονός ότι οι πιο γνωστές λειτουργίες του TNFα έχουν αποδοθεί σε σήματα μετασχηματισμένα από τον υποδοχέα TNFR1 με τον υποδοχέα TNFR2 να διαδραματίζει πρωταρχικά ρυθμιστικό ρόλο όσο αφορά στη σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα και στη μεταγωγή του σήματος. Ωστόσο, και οι δύο υποδοχείς φαίνονται να ενεργοποιούν πολλαπλές κινάσες και φωσφατάσες, χρησιμοποιώντας εν τέλει όλες τις κύριες κυτταρικές οδούς μεταγωγής. Επίσης, και οι δύο υποδοχείς TNF μπορούν να απελευθερωθούν από τη κυτταρική επιφάνεια μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης και να υφίστανται ως διαλυτή μορφή. (24,25)

Ως μια πολυλειτουργική κυτοκίνη, ο TNFα ασκεί μια σειρά βιολογικών δράσεων σε διαφορετικά κύτταρα, ιστούς, όργανα και είδη ενώ έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει και παρεμβαίνει στον ενεργειακό μεταβολισμό, ιδιαίτερα όσο αφορά στη λιπιδιακή ομοιόσταση. Οι επιδράσεις του TNFα στο

μεταβολισμό των λιπιδίων περιλαμβάνουν κυρίως πέντε πτυχές. Χαρακτηριστικά, καταστέλλει την πρόσληψη ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) και προωθεί τη λιπογένεση, επάγει λιπόλυση, αναστέλλει τη δραστηριότητα των ενζύμων που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων, ρυθμίζει το μεταβολισμό της χοληστερόλης καθώς και την έκφραση και την έκκριση λιποκινών, κυτοκινών δηλαδή που προέρχονται από λιποκύτταρα.

Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) αποτελούν τα βασικά συστατικά για τη σύνθεση τριακυλογλυκερολών (TAG), μορφή σταγονιδίων με την οποία γίνεται η σύνθεση των λιποκυττάρων. Γενικά, υπάρχουν τρεις πηγές FFA, από την κυκλοφορία, από τη λιπόλυση των ενδοκυτταρικών TAG ή από τη *de novo* σύνθεση FFA από γλυκόζη. Ως εκ τούτου, η διαθεσιμότητα των σχετικών υποστρώματα καθώς και η ρύθμιση πολλών σχετιζόμενων ενζυματικών οδών επηρεάζουν τη συνολική μεταβολική ροή των λιπιδίων προς TAG.

Ο TNFα ασκεί διαφορετική βιολογική δράση στο ήπαρ και στο λιπώδες ιστό. Συγκεκριμένα, στο ήπαρ ο TNFα διεγείρει τη *de novo* σύνθεση των ηπατικών λιπαρών οξέων αυξάνοντας τα επίπεδα κιτρικού και καταστέλλοντας την υπεροξυσωματική β-οξείδωση με αναστολή της δραστηριότητας του υπεροξυσωματικής οξειδάσης του λιπιδιακού ακυλο-CoA. Αντίθετα, στο λιπώδη ιστό, η αύξηση των λιπαρών οξέων μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω της διάσπασης των τρυγλυκεριδίων είτε μέσω της ρύθμισης των FAT, FATP και FABP4/aP2, πρωτεϊνών που εντοπίζονται στο λιπώδη ιστό. Αναλυτικότερα, η FAT είναι η τρανσλοκάση των λιπαρών οξέων (Fatty acid Translocase), η FATP (Fatty acid transport protein) αποτελεί πρωτεΐνη μεταφορέας ενώ η FABP4 προσδένεται με λιπαρά οξέα (Fatty Acid Binding Protein). (26)

### 5.1 Ρύθμιση της λιπόλυσης από τον TNF-α

Η διαδικασία της λιπόλυσης ρυθμίζεται τόσο από ορμονικά όσο και από βιοχημικά σηματοδοτικά μόρια. Η κατάλυσή της πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο από τρεις λιπάσες, τη λιπάση τριγλυκεριδίων των λιποκυττάρων (ATGL), την ευαίσθητη σε ορμόνες λιπάση (HSL) και τη λιπάση μονοακυλογλυκερόλης (MGL). Οι ATGL και HSL αποτελούν τις σημαντικότερες λιπάσες στον λιπώδη ιστό καθώς καταλύουν κυρίως την

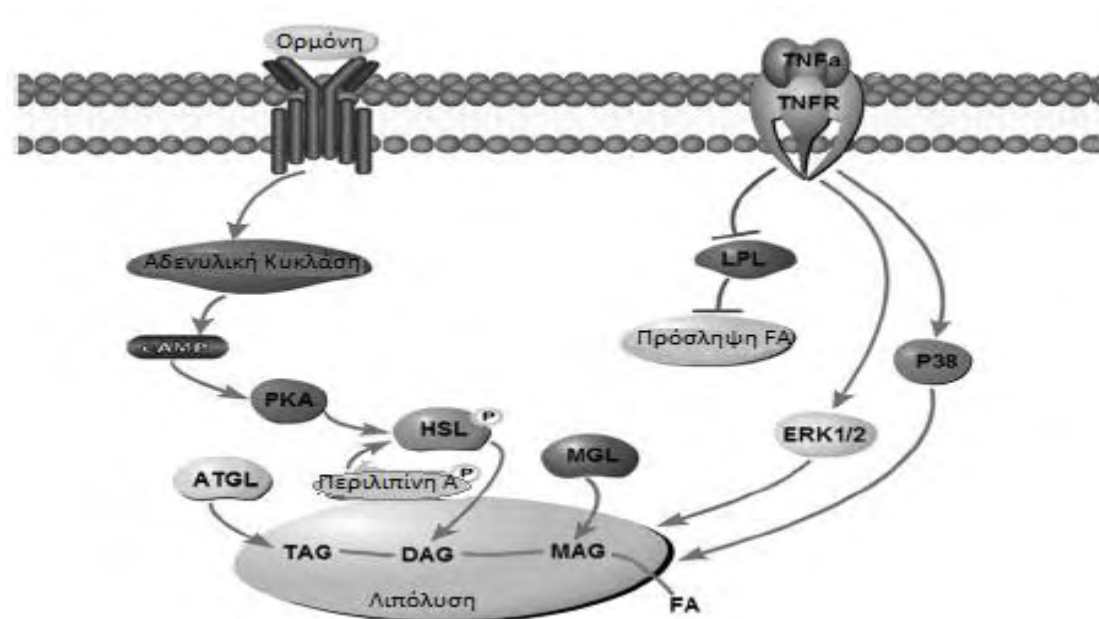
υδρόλυση του πρώτου εστερικού δεσμού της τριακυλογλυκερόλης προς τη δημιουργία διακυλογλυκερόλης (DAG). Στη συνέχεια, η HSL υδρολύει την DAG σε μονοακυλογλυκερόλη (MAG), η οποία καταλύεται περαιτέρω από την MGL. Επιπλέον, μερικές πρωτεΐνες των σταγονιδίων λιπιδίων, όπως η περιλιπίνη, οι οποίες είναι σημαντικές για την προστασία ή την έκθεση του πυρήνα των τριακυλογλυκερών των σταγονιδίων στις λιπάσες, είναι επίσης ισχυροί ρυθμιστές της λιπόλυσης.

Κατά τη λιπόλυση, η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του cAMP αυξάνεται ύστερα από διέγερση της αδενυλικής κυκλάσης. Στη συνέχεια, το cAMP ενεργοποιεί τη πρωτεϊνική κινάση A (PKA) η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την HSL. Η περιλιπίνη A συμμετέχει επίσης στην υδρολυτική δράση της HSL. Υπό ορμονική διέγερση, αυτή φωσφορυλιώνεται από την PKA και ρυθμίζει περαιτέρω την PKA-εξαρτώμενη οδό λιπόλυσης στα λιποκύτταρα. Η HSL είναι πιο ενεργή έναντι των DAG και των εστέρων χοληστερόλης (CEs) από ότι των TAG και MAG. Επιπλέον, καθώς η ATGL αποτελεί μια TAG υδρολάση, δεν μπορεί να υδρολύσει εστέρες χοληστερόλης ή ρετινόλης.

Όσο αφορά στο γονίδιο της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης LPL στα ψάρια, αυτό έχει ταυτοποιηθεί σε διάφορα είδη όπως στο red sea bream (*Pagrus major*), στο rainbow trout (*O. Mykiss*) και στο grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Η ύπαρξη του mRNA της LPL έχει εντοπιστεί στο ήπαρ, στον νεφρό της κεφαλής, στο μεσεντερικό λιπώδες ιστό, στη καρδιά και στο λευκό μυϊκό ιστό των ενήλικων ατόμων. Η δραστηριότητα της LPL έχει ανιχνευθεί τόσο στο ήπαρ, στο λιπώδη ιστό, στο μυ, στη καρδιά όσο και στον εγκέφαλο και στις βιταλογενείς ωοθήκες. Δύο ισομορφές LPL, οι οποίες επιβεβαιώνονται ως βασικά ένζυμα του μεταβολισμού των λιπιδίων, υπάρχουν στη τσιπούρα (*gilthead sea bream*) με διαφορεική και ιστο-ειδική γονιδιακή έκφραση μεταξύ του λιπώδους και του μυϊκού ιστού. Επιπλέον, η έκφραση του γονιδίου της LPL ρυθμίζεται διαφορετικά ανάλογα με τις διατροφικές συνθήκες και με τα ορμονικά επίπεδα που οφείλονται στις διαφορετικές ανάγκες λιπαρών οξέων κάθε ιστού.

Ο TNFα επηρεάζει άμεσα το μεταβολισμό λιπιδίων είτε μέσω της αναστολής της πρόσληψης των λιπαρών οξέων είτε μέσω της διαδικασίας της λιπογένεσης. Επιπλέον, διεγείρει την απελευθέρωση λιπαρών οξέων μέσω της λιπόλυσης. Ο TNFα αναστέλλει την δραστηριότητα της

λιποπρωτεΐνης LPL στο λιπώδη ιστό ενώ διεγείρει την λιπόλυση στα λιποκύτταρα. Η διέγερση της λιπόλυσης πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης της κινάσης ERK1/2 και της κινάσης p38. Ο TNFα αναστέλλει την LPL και αυξάνει την απελευθέρωση γλυκερόλης που με τη σειρά της περιορίζει την απορρόφηση λιπαρών οξέων από τους ιστούς και την τελική αύξηση των αποθεμάτων λιπιδίων στους ιστούς. (27)



Εικόνα 5. Η διαδικασία της λιπόλυσης και η επίδραση του TNFα στην λιπόλυση. (27)

Ένας άλλος τρόπος μέσω του οποίου μπορεί να επηρεάσει ο TNFα το μεταβολισμό των λιπιδίων είναι η ρύθμιση ενζύμων που σχετίζονται με αυτόν. Από τις πρώτες μελέτες φαίνεται ότι ο TNFα αναστέλλει τη συσσώρευση της καρβοξυλάσης του ακετυλο-CoA, ένζυμο που διαθέτει ρυθμιστικό ρόλο στη πορεία βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας, καθώς και την έκφραση του αντίστοιχου mRNA του γονιδίου. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η ενεργότητα του TNF-α σε μη διαφοροποιημένα προ-λιποκύτταρα είναι σημαντικά μειωμένη. Ως αποτέλεσμα, παρατηρείται και μειωμένη μεταγραφή του ενζύμου σε κυτταρικές σειρές προ-λιποκυττάρων. Άλλες μελέτες, ωστόσο, έδειξαν ότι η συνθετάση λιπαρών οξέων και η καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA αυξήθηκαν κατά 35 και 58%, αντίστοιχα, μετά από 16 ώρες θεραπείας αρουραίων με TNF και στους οποίους ο TNF



φάνηκε να ρυθμίζει άμεσα τη σύνθεση λιπαρών οξέων στο ήπαρ με αύξηση των ηπατικών επιπέδων κιτρικού. Αυτό έχει επιβεβαιωθεί και μια άλλη μελέτη, η οποία κατέδειξε ότι το κιτρικό, ένας αλλοστερικός ενεργοποιητής της καρβοξυλάσης του ακετυλο-CoA, προκαλούσε αλλαγές στο ρυθμό σύνθεση των λιπαρών οξέων, επαγόμενο από τη δράση του παράγοντα TNFα.

Συνοπτικά, τα περισσότερα από τα σημαντικά ένζυμα που εμπλέκονται στο λιπιδιακό μεταβολισμό όπως η LPL, η HSL, η ATGL και η καρβοξυλάση του ακετυλ-CoA θα μπορούσαν να ρυθμίζονται από τον TNFα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτός ο μηχανισμός ρύθμισης μπορεί να επηρεάσει την έκφραση του mRNA σε μεταγραφικό επίπεδο. Μερικές φορές, μπορεί επίσης να εμπλέκεται η άμεση αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο λιπώδης ιστός δεν θεωρείται πλέον ένας αδρανής ιστός που σχετίζεται εξ'ολοκλήρου με την αποθήκευση ενέργειας, αλλά αναδεικνύεται σταδιακά ως ένα ενεργό ενδοκρινές όργανο και ένα σημαντικό διαμεσολαβητή που εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες όσον αφορά στον ενεργειακό μεταβολισμό. (26)

## 5.2 Το γονίδιο του TNF-α στα ψάρια

Το γονίδιο του TNFα έχει κλωνοποιηθεί σε πολλά είδη ψαριών, συμπεριλαμβανομένων της πέστροφας *Oncorhynchus mykiss*, της τσιπούρας *Sparus auratus*, του κυπρίνου *Cyprinus carpio*, του γατόψαρου *Ictalurus punctatus*, του φούγκους *Fugu rubripes*, του zebrafish *Danio rerio*, του λαβρακιού *Dicentrarchus labrax*, του κυπρίνου *Ctenopharyngodon idella* και άλλων ειδών. Πολλαπλές ισομορφές έχουν αναγνωριστεί σε ορισμένα ψάρια, όπως τρία γονίδια TNFα στον κοινό κυπρίνο και δύο γονίδια στη πέστροφα *Oncorhynchus mykiss*, στον μπλέ τόνο *Thunnus orientalis* και στη σφυρίδα *Epinephelus coioides*. Αυτές οι ισομορφές του TNFα έχουν προκύψει πιθανόν από το εξελικτικό γεγονός του ολικού διπλασιασμού του γονιδιώματος των τελεοστέων, όπως έχουν προκύψει πιθανόν και άλλες κυτοκίνες των ιχθύων, όπως η M-CSF και η IL-1b, για τις οποίες δύο κυρίαρχες μορφές υφίστανται στα ψάρια.

Εκτός από την παρουσία πολλαπλών ισομορφών του TNFα στο γονιδίωμα των τελεοστέων, διαφορές από τους αντίστοιχους γενετικούς

τόπους των θηλαστικών έχουν αναφερθεί από την άποψη της διαμόρφωσης της έκφρασης και της βιοδραστικότητας του παράγοντα σε ορισμένα είδη ψαριών. Για παράδειγμα, στη σφυρίδα, μια ισομορφή εκφράζεται έντονα ιδιοσυστατικά, αλλά δεν ρυθμίζεται θετικά μέσω ανοσολογικής απόκρισης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Στον τόνο, στη σφυρίδα και στη πέστροφα, τα παράλογα γονίδια του TNFα εκφράζονται και ρυθμίζονται διαφορετικά. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει, ενδεχομένως, την ύπαρξη επιμερισμού των λειτουργιών του παράγοντα σε διαφορετικά είδη ψαριών. Η διαφορετική αυτή έκφραση των παραλόγων θα μπορούσε να επιτρέπει μια πιο λεπτή ρύθμιση των κυτοκινών που ελέγχονται από τον TNFα σε αυτά τα είδη. (25)

## 6. Λεπτίνη(LEP)

Μια σημαντική εξέλιξη στη μελέτη της ρύθμισης του ενεργειακού ισοζυγίου έρχεται με την ανακάλυψη της λεπτίνης το 1994, προϊόν της έκφρασης του γονιδίου *ob*. Όσο αφορά στην δράση της, η λεπτίνη ενημερώνει τον εγκέφαλο για την αφθονία του σωματικού λίπους, μεταβάλλοντας έτσι τη συμπεριφορική, μεταβολική και ενδοκρινολογική φυσιολογία του οργανισμού με βάση την διατροφική κατάσταση στην οποία αυτός βρίσκεται. Η λεπτίνη αποτελείται από τέσσερις αντιπαράλληλες α-έλικες, που συνδέονται με δύο διασυνδέσεις και έναν μικρό μεγέθους βρόγχου, που είναι τοποθετημένα σε μια αριστερόστροφη περιστρεφόμενη ελικοειδής δομή. Οι γωνίες μεταξύ των ελίκων και τα χαρακτηριστικά των μακρών βρόχων διασταύρωσης είναι παρόμοια με εκείνα που βρίσκονται στην κρυσταλλική δομή των ελικοειδών κυτοκινών μακράς αλυσίδας, οι οποίες περιλαμβάνουν τους παράγοντες GSCF (granulocyte colony-stimulating), LIF, CNTF καθώς και τον ανθρώπινο αυξητικό παράγοντα GH. (28)

Η λεπτίνη, μια πρωτεΐνη 16 kDa που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ob*, εκκρίνεται κυρίως από το λιπώδη ιστό. Ο έλεγχος της όρεξης είναι ο πρωταρχικός ρόλος της λεπτίνης καθώς και η ρύθμισή, λειτουργία που σημαντική για τον έλεγχο της πρόσληψης της τροφής, του σωματικού βάρους και της ενεργειακής ομοιόστασης του οργανισμού. Αυτές οι δράσεις της λεπτίνης πιθανόν πραγματοποιούνται από τη δέσμευση του μορίου στον

υποδοχέα του και την επακόλουθη ενεργοποίηση της οδού Jak/Stat ή με την άμεση διέγερση της πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK) που ενεργοποιείται από το 5-AMP, η οποία θα φωσφορυλιώσει και θα αναστείλλει στη συνέχεια τη δραστηριότητα της καρβοξυλάσης του ακετυλο-CoA και κατ'επέκτασιν τη λιπογένεση. (26)

Η διαδικασία της βιοσύνθεσης της λεπτίνης καθώς και η απελευθέρωση της διέπονται από παρακρινή, ενδοκρινή και νευροενδοκρινή σήματα που καταφθάνουν στα λιποκύτταρα. Επειδή η λεπτίνη εκκρίνεται από τα λιποκύτταρα σε αναλογία με τα αποθέματα του σωματικού λίπους, αυτή διαδραματίζει βασικό ρυθμιστικό ρόλο στην ομοιόσταση των ενεργειακών αποθεμάτων. Συνεπώς, η έκφραση του γονιδίου *ob* υπόκειται σε διατροφική ρύθμιση. Η νηστεία προκαλεί πτώση των επιπέδων του αντίστοιχου mRNA, κατάσταση η οποία αντιστρέφεται γρήγορα κατά την επαναπρόσληψη τροφής με αποτέλεσμα τα επίπεδα λεπτίνης στην κυκλοφορία να αλλάζουν παράλληλα με τα επίπεδα του mRNA στους ιστούς.

Επιπλέον, εκτός του ότι η λεπτίνη έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου της καρβοξυλάσης του ακετυλο-CoA, καταστέλλει επίσης και τη σύνθεση λιπαρών οξέων και λιπιδίων. Οι συγκεκριμένες βιοχημικές αντιδράσεις που συμβάλλουν στο λιπιδιακή συσσώρευση πραγματοποιούνται χωρίς τη συμμετοχή κεντρικών μεταγωγικών μονοπατιών. Έτσι η λεπτίνη εμπλέκεται στην άμεση ρύθμιση των μεταβολικών διεργασιών του λιπώδους ιστού τόσο με την αναστολή της λιπογένεσης όσο και με τη διέγερση της λιπόλυσης. Η ινσουλίνη διεγείρει την έκφραση του γονιδίου *ob*, όπως τα οιστρογόνα και τα γλυκοκορτικοειδή, με τις επιπτώσεις των τελευταίων όμως να παρουσιάζουν μια πιο μακροπρόθεσμη δράση. (28)

Στα θηλαστικά, η λεπτίνη συντίθεται από το λιπώδη ιστό και εκκρίνεται στο αίμα. Καθώς αυξάνονται τα λιπιδιακά αποθέματα, η έκφραση της λεπτίνης και οι συγκεντρώσεις στον ορό αυξάνονται ανάλογα με τα συνολικά αποθέματα λίπους. Η λεπτίνη δεσμεύεται στους υποδοχείς της λεπτίνης στον υποθάλαμο, η οποία ενεργοποιεί τις οδούς JAK-STAT μεταβάλλοντας τα επίπεδα μεταγραφής και επηρεάζοντας το φαινότυπο του οργανισμού. Όταν τα λιπιδιακά αποθέματα εξαντλούνται, τα επίπεδα λεπτίνης που κυκλοφορούν στο αίμα μειώνονται και η επίδραση στον φαινότυπο αντιστρέφεται. Για παράδειγμα, υψηλά επίπεδα λεπτίνης

μειώνουν την όρεξη ενώ χαμηλά επίπεδα διεγείρουν την όρεξη. Έχει προταθεί ότι η λεπτίνη εξελίχθηκε ως σήμα λιμοκτονίας καθώς τα χαμηλά λιπιδιακά αποθέματα οδηγούν σε χαμηλά επίπεδα λεπτίνης, τα οποία μεταδίδουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα ότι η ενέργεια δεν είναι διαθέσιμη ή επαρκής για διαδικασίες που δεν είναι βιώσιμες.

Παρόλο που η κλωνοποίηση του γονιδίου της λεπτίνης σε πολλαπλά είδη θηλαστικών πραγματοποιήθηκε με γρήγορους ρυθμούς, η ταυτοποίηση ενός ορθόλογου γονιδίου της λεπτίνης μεταξύ ποικιλόθερμων δεν συνέβη μέχρι και 11 χρόνια μετά την ανακάλυψη της λεπτίνης σε ποντίκια. Στην περίπτωση του ψαριού *fugu*, η πρωταρχική δομή της λεπτίνης παρουσιάζει μόνο 13% ομοιότητα με την ανθρώπινη λεπτίνη. Ωστόσο, με μελέτη της κρυσταλλογραφίας των δύο πρωτεϊνών, παρατηρήθηκε ότι η τριτοταγής δομή της λεπτίνης στα ψάρια είναι αρκετά όμοια με εκείνη στα θηλαστικά. Μια ειδοποιός διαφορά που σχετίζεται με την λεπτίνη στα ψάρια είναι ότι αυτή δεν εκφράζεται στο λιπώδη ιστό, αλλά κυρίως στο ήπαρ. Κατά την πλειοψηφία των ψαριών, ο ηπατικός ιστός είναι εκείνος με τη μεγαλύτερη έκφραση λεπτίνης, αν και ο ιστός των γονάδων στη περίπτωση του *zebrafish* είναι εκείνος που εμφανίζει τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης.

Σε αντίθεση με τα ζώα της στερίας που διαθέτουν ένα μοναδικό αντίγραφο του γονιδίου της λεπτίνης, διπλασιασμένα γονίδια λεπτίνης έχουν ταυτοποιηθεί στο *zebrafish*, στο *Japanese medaka*, στον κοινό κυπρίνο και στο χρυσόψαρο. Φυλογενετικές αναλύσεις υποστηρίζουν το συμβάν ενός αρχαίου διπλασιασμού της λεπτίνης σε λεπτίνη α και λεπτίνη β μετά τον διαχωρισμό των θηλαστικών της στερίας σε συνδυασμό με τουλάχιστον ένα επιπλέον γονιδιωματικό διπλασιασμό που χαρακτηρίζει και την περίπτωση των τελεοστέων. Μολονότι παρουσιάζουν διακριτή πρωτοταγή δομή, είναι πιθανόν ότι όλες οι ισομορφές της λεπτίνης στα ψάρια διαθέτουν παρόμοια λειτουργία, δεδομένου ότι η τριτοταγής δομή είναι γενικά συντηρημένη.

(29)

## 7. Σκοπός Εργασίας

Η τσιπούρα αποτελεί ένα βασικό είδος εκτρεφόμενων ψαριών που υπάρχει στη περιοχή της Μεσογείου και για αυτό το λόγο παρουσιάζει μεγάλον ενδιαφέρον. Συνεπώς, υπάρχει αυξημένη ζήτηση μεθόδων που να ελέγχουν την ποιότητα και την ανάπτυξη αυτού του είδους σε όλα τα στάδια παραγωγής του. Απαραίτητο, λοιπόν, στοιχείο είναι η γνώση των μηχανισμών αύξησης του ψαριού που σχετίζονται τόσο με την αύξηση των μυών όσο και με την εναπόθεση λίπους, με στόχο τη βελτιστοποίηση του παραγόμενου προϊόντος όσο αφορά είτε στη διατροφική του αξία είτε στο οικονομικό του όφελος.

Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων του PPAR $\gamma$ , του TNF $\alpha$  και της λεπτίνης, γονιδίων που σχετίζονται με τον λιπιδιακό μεταβολισμό, σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των προνυμφών της τσιπούρας με στόχο την διερεύνηση των μηχανισμών που σχετίζονται με την ανάπτυξη του μυός και την εναπόθεση του λίπους κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του είδους. Επιπλέον, ένα επιπρόσθετο αντικείμενο μελέτης είναι ο εντοπισμός των διαφορών στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων σε προνύμφες τσιπούρας διαφορετικού μεγέθους, αλλά ίδιου αναπτυξιακού σταδίου.

## 8. Υλικά και Μέθοδοι

### 8.1 Ψάρια και στάδια δειγματοληψίας

Οι προνύμφες της τσιπούρας ελήφθησαν από εμπορικό ιχθυογεννητικό σταθμό της εταιρείας ΔΙΑΣ ΑΕ που βρ' σκεται στον Μαλιακό κόλπο στην Ελλάδα. Οι προνύμφες διατηρήθηκαν σε φιλτραρισμένο και συνεχώς αεριζόμενο θαλασσινό νερό (αλατότητα 29ppt). Οι προνύμφες σιτίστηκαν σε περίσσεια, δύο φορές την ημέρα με τροχόζωα (rotifers) μέχρι την 23 dph και από την 13-25 dph τους δόθηκε επίσης και *Artemia nauplii*. Τα τροχόζωα εμπλουτίστηκαν με επώαση 24 h σε DHA Master (Inve, Belgium) και η *Artemia nauplii* με επώαση 24 h ας S.presso (Inve). Την 20 dph η διατροφή περιλάμβανε ξηρή εμπορική τροφή (INVE O.range start, wean). Η προσθήκη των μικροάλγεων *Chlorella minutissima* έγινε κατά τη διάρκεια σίτισης με τροχόζωα. Οι προνύμφες βρίσκονταν κάτω από 24 h σύστημα φωτισμού μέχρι την 25 dph και μετά έγινε εναλλαγή σε 15:9, φως:σκοτάδι. Η συγκέντρωση του οξυγόνου στο αλατόνερο ήταν  $7 \pm 2 \text{ mg l}^{-1}$  και η θερμοκρασία του νερού κατά την εμβρυϊκή περίοδο, την περίοδο του λεκιθικού σάκου (0-4 dph) και το στάδιο προνύμφης-ιχθυδίου (5-60 dph) ήταν  $19.0 \pm 0.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (18.0-20.5  $^{\circ}\text{C}$ ).

Η δειγματοληψία για τις προνύμφες της τσιπούρας έγινε τις ημέρες 5, 15, 25, 35, 48, 58 dph. Οι προνύμφες αναισθητοποιήθηκαν σε 2-φαινοξυαιθανόλη (1:5000, Sigma-Aldrich, P1126). Τα δείγματα για την ανάλυση της έκφρασης γονιδίων τοποθετήθηκαν σε αντιδραστήριο RNeasy Lysis Reagent (Sigma-Aldrich, R0901) και διατηρήθηκαν στους -20  $^{\circ}\text{C}$  μέχρι την χρήση τους.

### 8.2 Απόμονωση RNA

Το ολικό RNA απομονώθηκε από κάθε άτομο προνύμφης των 5, 15, 25, 35, 48, 58 (shorted SM και LA) dph με τη χρήση του TRI Reagent (Sigma, T9424) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Έπειτα, το ολικό RNA υποβλήθηκε σε αντίδραση με DNase DNA-free (Ambion, AM1906) για να αφαιρεθούν τα υπολείμματα γενωμικού DNA ώστε να μην υπάρχει

επιμόλυνση και τέλος αποθηκεύτηκε στους -80 °C μέχρι την χρήση του. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε παράλληλα για όλα τα δείγματα για να εξασφαλιστεί η ίδια απόδοση της αντίδρασης. Το cDNA παράχθηκε από 1 μg ολικού RNA με χρήση 200 U/μl SuperScript II transcriptase (Invitrogen, 18064-014), 3 μg τυχαίων εκκινητών (Invitrogen, 48190-011) και 40 U/μl ανασυνδυασμένης RNaseOUT αναστολέα ριβονουκλεάσης (Invitrogen, 10777-019) σε τελικό όγκο αντίδρασης 27 μl.

### 8.3 Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων με Q-PCR

Έγινε καθορισμός της έκφρασης των γονιδίων PPaRγ, TNFα και της λεπτίνης. Η Q-PCR (real-time PCR) έγινε με μηχανήμα MXPro 2000 (Stratagene) με Applied Biosystems SYBR Green Master Mix (2x; Applied Biosystems, 4472908). Όλες οι αντιδράσεις περιείχαν 200 nmol/l για κάθε εκκινητή και 0.17 μg/μl cDNA (αραίωση 1:5) σε όγκο αντίδρασης 20 μl. Οι αλληλουχίες των εκκινητών φαίνονται στον Πίνακα 2. Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συνθήκες για την Q-PCR: ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης στους 95 °C για 10 min, 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού (κάθε κύκλος αποτελείται από 30 sec στους 95 °C, 1 min στους 61°C και 1 min στους 72°C) και τέλος ακολουθεί το στάδιο της καμπύλης διαχωρισμού (dissociation curve) (1 min στους 95 °C, 30 sec στους 55 °C και 30 sec στους 95 °C) ώστε να επαληθευτεί ο πολλαπλασιασμός ενός μόνο προϊόντος. Η απόδοση της real-time PCR (E) υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο  $E = 10^{-1/\text{slope}}$  (30) και ήταν 100.04 % για τον PPaRγ, 100.04 % για τον TNFα και 100.09 % για τη λεπτίνη. Χρησιμοποιήθηκε σειρά ιδιοστατικών γονιδίων (EF1a, b-actin, RPL13a) για την κανονικοποίηση της έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων (38).

Γονίδιο	Forward Εκκινητής	Reverse Εκκινητής
PPaRγ	TGTCAAATGATGGAGCCAAA	GAGAGTGAAGCACCGTCTCC
TNFα	CCTCTCAGCCACAGGATCTC	CAGTTTGTGCGCTCTGTTCA
Λεπτίνη	CAATGCCAACTGTCCATGCT	CGTTGCCATACAAACACACC

Πίνακας 2. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την real-time PCR

#### 8.4 Στατιστική Ανάλυση

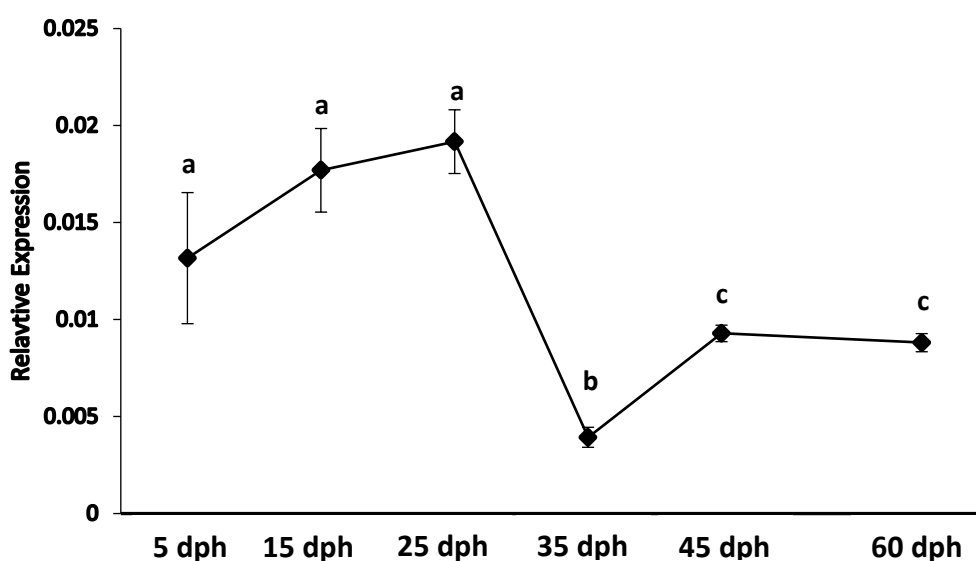
Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση one-way ANOVA για τη σύγκριση των διαφορών της έκφρασης των τριών γονιδίων στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια (5,15,25,35,45,48 dph). Το T-test χρησιμοποιήθηκε για συγκρίσεις μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων καθώς και μεταξύ των ατόμων στα 58 dph στα οποία είχε γίνει διαλογή βάσει του μεγέθους τους (58SM, 58LA). Η αναπαράσταση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων έγινε ως μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση και για όλες τις στατιστικές αναλύσεις το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε για  $P < 0.05$ .



## 9. Αποτελέσματα

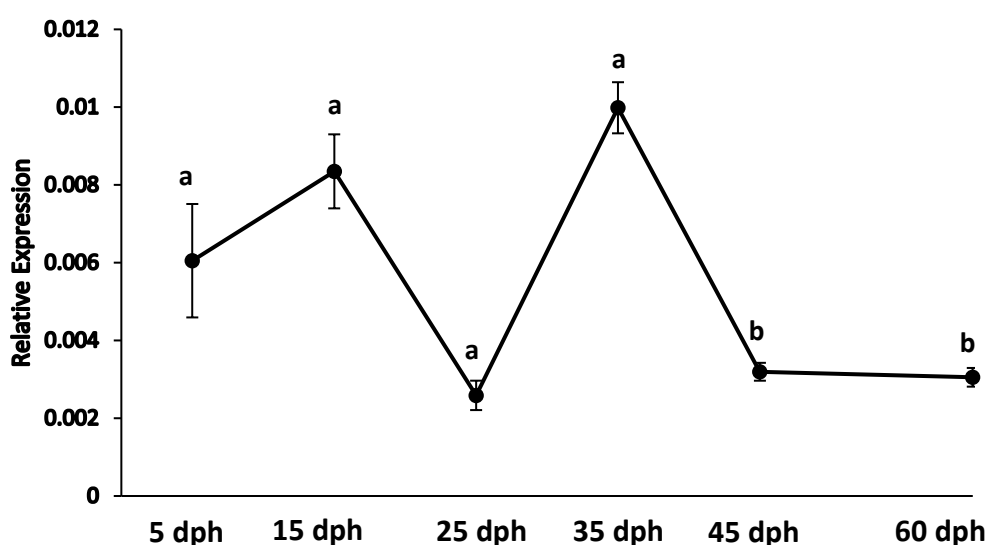
### 9.1 Έκφραση των γονιδίων στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας.

Η έκφραση του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα PpaRγ παρουσίασε σημαντικές διακυμάνσεις στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (Εικόνα 6). Από την 5 dph μέχρι και την 25 dph υπάρχει μια σταδιακή αύξηση των επιπέδων έκφρασης χωρίς όμως αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Η έκφραση του γονιδίου παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση από την 25 dph έως την 35 dph και μια μετέπειτα στατιστικώς σημαντική αύξηση από την 35 dph ως την 45 dph, από την οποία και ύστερα η έκφραση διατηρήθηκε σταθερή έως και την 60 dph.



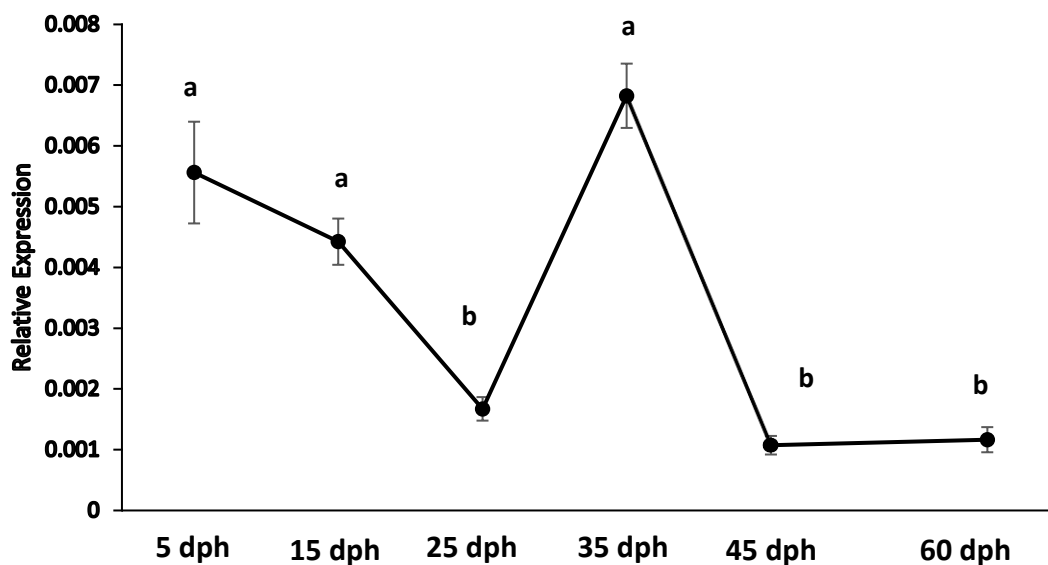
Εικόνα 6. Σχετική έκφραση του PPaRγ στη τσιπούρα στα αναπτυξιακά στάδια 5, 15, 25, 35, 45 και 60 dph. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές εκτιμήθηκαν με one-way ANOVA. Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε για  $P < 0.05$ . Οι τιμές του γραφήματος παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Σημεία που φέρουν τα ίδια γράμματα δεν είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικά μεταξύ τους.

Η έκφραση του TNF $\alpha$  παρουσίασε μια σταδιακή αύξηση και μείωση την ημέρα 25 dph με μια επακόλουθη κορύφωση των επιπέδων της την ημέρα 35 dph. Από την ημέρα 35 dph και έπειτα η έκφραση του γονιδίου μειώνεται στατιστικώς σημαντικά μέχρι και την ημέρα 45 dph διατηρώντας χαμηλά επίπεδα έως και την ημέρα 60 dph, επίπεδα τα οποία παρουσιάζονται μικρότερα από εκείνα της ημέρας 5 dph. (Εικόνα 7)



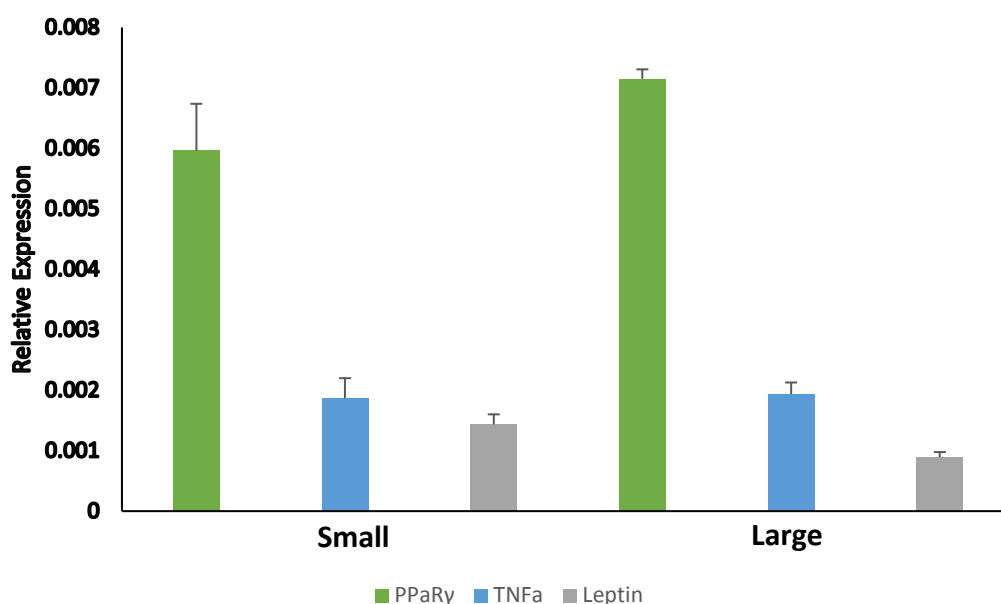
Εικόνα 7. Σχετική έκφραση του TNF $\alpha$  στη τσιπούρα στα αναπτυξιακά στάδια 5, 15, 25, 35, 45 και 60 dph. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές εκτιμήθηκαν με one-way ANOVA. Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε για  $P < 0.05$ . Οι τιμές του γραφήματος παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Σημεία που φέρουν τα ίδια γράμματα δεν είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικά μεταξύ τους.

Η έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης παρουσίασε παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με εκείνο του TNF $\alpha$  με τη διαφορά ότι αυτή άρχισε να μειώνεται σταδιακά από την ημέρα 5 dph μέχρι και την ημέρα 25 dph όπου και απέκτησε μια σημαντικώς στατιστική διαφορά. Επιπλέον, το γονίδιο ανέδειξε εξίσου μια κορύφωση της έκφρασης του την ημέρα 35 dph, ενώ μετέπειτα η έκφραση του μειώθηκε και διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα μέχρι και την ημέρα 60 dph. (Εικόνα 8)



Εικόνα 8. Σχετική έκφραση της λεπτίνης στη τσιπούρα στα αναπτυξιακά στάδια 5, 15, 25, 35, 45 και 60 dph. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές εκτιμήθηκαν με *one-way ANOVA*. Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε για  $P < 0.05$ . Οι τιμές του γραφήματος παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Σημεία που φέρουν τα ίδια γράμματα δεν είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικά μεταξύ τους.

Η έκφραση των τριών γονιδίων μετρήθηκε επίσης κατά την 58 dph στα άτομα των προνυμφών που χαρακτηρίστηκαν από διαφορετικό μέγεθος (SM και LA). Στο σχήμα φαίνεται ότι τα άτομα με το μικρότερο μέγεθος (SM) είχαν και τη μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης, η οποία βρέθηκε στατιστικώς σημαντικά μειωμένη στο άτομα που είχαν μεγαλύτερο μέγεθος (LA). Η έκφραση των δυο υπόλοιπων γονιδίων συγκριτικά με το μέγεθος παρουσίασε μη στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Τα LA άτομα είχαν μέσο βάρος 0.0067 g και το μήκος τους κυμαίνονταν στα 1.4-2.1 cm. Αντίστοιχα, τα SM είχαν μέσο βάρος 0.029 g και το μήκος τους κυμαίνονταν στα 1.3-1.8 cm. (Εικόνα 9)



*Εικόνα 9. Σχετική έκφραση των γονιδίων στην τσιπούρα κατά την 58 dph σε άτομα διαφορετικού μεγέθους (SM, LA). Η έκφραση της λεπτίνης στα μικρά άτομα είναι στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη από την έκφραση στα μεγάλα άτομα. Τα υπόλοιπα δύο γονίδια δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε για  $P < 0.05$ .*

## 10. Συζήτηση

Η παρούσα εργασία είχε δυο βασικά αντικείμενα μελέτης. Πρώτον, την μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των τριών γονιδίων PPAR $\gamma$ , TNF $\alpha$  και της λεπτίνης καθώς και τη μελέτη της έκφρασης τους σε άτομα διαφορετικού μεγέθους. Και τα τρία γονίδια είναι γονίδια που σχετίζονται με τον λιπιδιακό μεταβολισμό και συνεπώς η μελέτη τους μπορεί να μας παρέχει γνώσεις για τις διαδικασίες της λιπογένεσης ή της λιπόλυσης κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια της προνύμφης στη τσιπούρα.

Ο λιπώδης ιστός των ψαριών αποτελείται από λιποκύτταρα με μεγάλη ποικιλία διαμέτρων. Η παρουσία τόσων μικρών όσο και μεγάλων λιποκυττάρων υποδηλώνει υπερπλαστική και υπερτροφική ανάπτυξη. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε λιπίδια που υπάρχει στο περιεχόμενο της τροφής του ψαριού προκαλεί εξίσου αύξηση στο λιπιδιακό περιεχόμενο του ψαριού και στη σύνθεση λιπαρών οξέων (διαίτες που βασίζονται σε ψάρια ή

λαχανικά). Η εναπόθεση αυτού του λίπους γίνεται στις κύριες ανατομικές εναποθέσεις, γεγονός όμως που εξαρτάται από το είδος του ψαριού. Στην περίπτωση των σπαροειδών (*Sparidae*), οι εναποθέσεις πραγματοποιούνται κυρίως στο μυϊκό και σπλαχνικό λίπος. Συνεπώς, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η ομοιόσταση του λιπιδιακού μεταβολισμού εξαρτάται άμεσα από διατροφικούς παράγοντες. (15) Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι κατά τις ημέρες 15-20 dph, το ιχθύδιο έχει εξαντλήσει το λεκιθικό του σάκο και όντας ικανό να εκτελεί πιο ενεργές κινήσεις, τρέφεται πλέον εξωγενώς. (8)

#### 10.1 Η έκφραση των γονιδίων σε σχέση με τα στάδια της μυογένεσης στη τσιπούρα.

Από τότε που επιτεύχθηκε η ανακάλυψη της λεπτίνης, τα λιποκυττάρια καθώς και τα προϊόντα τους έχουν αποτελέσει αντικείμενο εντατικής επιστημονικής έρευνας. Έχει αποδειχθεί ότι ο λιπώδης ιστός παίζει κεντρικό ρόλο στην ενεργειακή ομοιόσταση, συμπεριφερόμενος ως ένα ενδοκρινές όργανο που εκφράζει μόρια τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση του μεταβολισμού. Επιπλέον, στη περίπτωση των σκελετικών μυών, έχουν επίσης πρόσφατα αποδειχθεί μερικά μόρια που ρυθμίζουν αυτά με τη σειρά τους το λιπιδιακό μεταβολισμό. Και οι δύο ιστοί πιθανόν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της επαρκούς αναλογίας σκελετικών μυών προς λίπος του σώματος ενός οργανισμού. Τόσο ο TNFα όσο και η λεπτίνη είναι μόρια που μπορεί να παίζουν αποφασιστικό ρόλο στη διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ του λιπώδους ιστού και του σκελετικού μυός. (33)

Στα ψάρια, το σώμα υποστηρίζεται ως επί το πλείστον από μυϊκές ίνες και όχι από τον σκελετό, ο οποίος είναι ιδιαίτερα σημαντικός όσο αφορά στα χερσαία ζώα. Οι πολυάριθμες μυϊκές ίνες συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω του συνδετικού ιστού. Ο χαλαρός συνδετικός ιστός κατανέμεται ευρέως στα ψάρια και αποτελείται σε μεγάλο ποσοστό από λιποκύτταρα. Το μέγεθος και η πυκνότητα των λιποκυττάρων ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του ιστού και την τοποθεσία του. Ο συνδετικός ιστός του μεσεντέρου, της κοιλιακής περιοχής και των πτερυγίων χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό λιποκυττάρων.

Ο μυϊκός ιστός στα ψάρια περιβάλλεται συνήθως από στρώματα υποδόριου λίπους, τα οποία είναι περισσότερο συγκεντρωμένα κατά μήκος της πλευρικής γραμμής του ερυθρού μυός και αποκτούν περισσότερο πάχος προς την κοιλιακή περιοχή και την περιοχή των πτερυγίων. Επιπλέον, τα λιποκύτταρα φαίνεται να αποτελούν τον κυριότερο τύπο κυττάρου σε αυτό στρώμα υποδερμικού ιστού. (32)

Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη, κατά τα πρώιμα στάδια της προνύμφης της τσιπούρας, η ανάπτυξη των μυών μετά το στάδιο της εμβρυονικής μυογένεσης περιλαμβάνει τα στάδια της υπερπλαστικής ανάπτυξης, της υπερτροφικής ανάπτυξης και της τελικής μωσαϊκής υπερπλασίας που λαμβάνει δράση μετά το τέλος της μεταμόρφωσης. Από την ημέρα 5 dph έως και την 25 dph, η ανάπτυξη των μυών γίνεται υπερπλαστικά, δηλαδή η στρατολόγηση σαρκομερικών πρωτεϊνών γίνεται με στόχο τη δημιουργία νέων μυϊκών ινιδίων. Το διάστημα μεταξύ των 25 και των 35 dph μπορεί να θεωρηθεί ως ένα μεταβατικό στάδιο, στο οποίο πραγματοποιείται πιθανόν η κατάλληλη κυτταρική σηματοδότηση για την έναρξη της υπερτροφικής ανάπτυξης. Από την ημέρα 35 dph και ύστερα λαμβάνει χώρα η υπερτροφία, κατά την οποία τα ήδη υπάρχοντα μυϊκά ινίδια αυξάνονται σε μέγεθος. Από την ημέρα 60 dph και ύστερα, όπου πλέον έχει ολοκληρωθεί η μεταμόρφωση, η μωσαϊκή υπερπλασία αποτελεί το πρότυπο με το οποίο αναπτύσσονται οι μυς. (31)

Και στα τρία γονίδια φάνηκε ότι οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης τους συμβάδιζαν με την ακολουθία των μυογενετικών σταδίων που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Όσο αφορά στην έκφραση του PPaRγ, αυτή παρουσίασε αυξημένα επίπεδα καθ'όλη τη διάρκεια της υπερπλασίας, ενώ μειώθηκε σημαντικά κατά την μεταβατική φάση και διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της υπερτροφίας. Το συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης ερμηνεύεται πιθανά με το γεγονός ότι η εμφάνιση και η εδραίωση νέων μυϊκών ινιδίων απαιτεί την υποστήριξη από τον συνδετικό ιστό. Συνεπώς, η έντονη μεταγραφική δραστηριότητα του PPaRγ είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση και τη δημιουργία λιποκυττάρων που θα περιβάλλουν το νεοσυντιθέμενο μυϊκό ιστό.

Σχετικά με την έκφραση των γονιδίων TNFα και της λεπτίνης που παρουσίασαν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης, αυτή ανέδειξε τα μέγιστα επίπεδα της στο σημείο των 35 dph, που τοποθετείται η λήξη της

υπερπλασίας, ενώ ύστερα σταδιακά όλο και μειώνονταν. Η αυξημένη έκφραση αυτών των μορίων σηματοδοτεί πιθανότατα τη μετάβαση μεταξύ των δύο αναπτυξιακών φάσεων, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω μελέτη για τη διελεύκανση των ακριβών μηχανισμών με τους οποίους αυτά το επιτυγχάνουν. Αξίζει να τονιστεί, επιπλέον, ότι η λιπολυτική δραστηριότητα που χαρακτηρίζει και τα δύο αυτά μόρια, πιθανόν λαμβάνει χώρα κατά τη μεταβατική φάση με στόχο την αύξηση των ενεργειακών αποθεμάτων του οργανισμού. Η προνύμφη, από την ημέρα 20 dph και ύστερα, τρέφεται πλέον εξωγενώς και πραγματοποιεί εντονότερες σωματικές κινήσεις, ενώ με τη δράση του PPaRγ των προηγούμενων ημερών έχει ήδη ξεκινήσει η λιπογένεση και η εναπόθεση λίπους σε διάφορες ανατομικές περιοχές του ιχθυδίου. Η χρήση, λοιπόν, των συγκεκριμένων ενεργειακών αποθεμάτων μπορεί να είναι απαραίτητη τόσο για την επιβίωση του ατόμου όσο και για την ολοκλήρωση της υπερτροφικής αναπτυξιακής διαδικασίας.

Επίσης, στη παρούσα μελέτη, οι προνύμφες των 58 dph που είχαν διαφορετικό μέγεθος, παρουσίασαν διαφορά και στην έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης. Αναλυτικότερα, άτομα μικρότερου μεγέθους βρέθηκαν με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης από ότι άτομα μεγαλύτερου μεγέθους. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η λεπτίνη πιθανόν να συσχετίζεται με το σωματικό μέγεθος ενός οργανισμού χρειάζονται περαιτέρω μελέτης καθώς και η δυνατότητα χρήσης της λεπτίνης ως μοριακού δείκτη για το αναπτυξιακό δυναμικό ενός οργανισμού.

## 11. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι η έκφραση των τριών υπό μελέτη γονιδίων επάγεται στις προνύμφες ψαριών της τσιπούρας κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης με το μέγιστο του PPaRγ να εμφανίζεται κατά την 25 dph με το τέλος της υπερπλασίας και με το μέγιστο των TNFα και της λεπτίνης να παρουσιάζεται στην ημέρα 35 dph, δηλαδή με την έναρξη της υπερτροφίας. Φαίνεται, επομένως, να υπάρχει συσχέτιση αυτών των γονιδίων με την ανάπτυξη και την αύξηση των μυών γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει μια είδους σχέση κατά την μετάβαση από την ζωνική υπερπλασία στην υπερτροφία των μυϊκών ινών.

Η έκφραση της λεπτίνης φαίνεται επίσης να μεταβάλλεται και ανάλογα με το μέγεθος της προνύμφης κατά την 58<sup>η</sup> ημέρα γεγονός που απαιτεί περαιτέρω μελέτη και τον ακριβή τρόπο συσχέτισης του γονιδίου της λεπτίνης με το σωματικό μέγεθος.



## 12. Βιβλιογραφία

1. L. Sola , A. Moretti , D. Crosetti , N. Karaiskou , A. Magoulas , A.R. Rossi , M. Rye , A. Triantafyllidis , and C.S. Tsigenopoulos.(2014) Gilthead seabream - *Sparus aurata*
2. Russell, B., Carpenter, K.E. & Pollard, D. (2014). *Sparus aurata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014
3. A. Moretti , M. P. Fernandez-Criado , G. Cittolin, R. Guidastri (1999) Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream
4. K. Coward, N.R. Bromage, O. Hibbitt & J. Parrington. (2002) Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish
5. Nathan H. Hart (1990) International Review Of Cytology, Vol. 121 Fertilization in Teleost Fishes: Mechanisms of Sperm-Egg Interactions
6. A. W. Kendall, Jr., E. H. Ahlstroman D H. G. Moser (1984) Early Life History Stages of Fishes and Their Characters.In: Cohen: Ontogeny, Systematics. Phylogeny
7. Thomas A. Heming, Randal K., Buddington (1988) Yolk Absorption In Embryonic And Larval Fishes. In Fish Physiology, vol XIA, pp.407-446
8. M. Patruno, G. Radaelli, F. Mascarello, M.D. Candia Carnevali (1998) Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* (L.) during development from hatching to juvenile.
9. J.H.S.Blaxter (1969) 4 Development: Eggs and Larvae Fish Physiology Volume 3 Pages 177-252S. Laurila, I.J. Holopainen (1990) Features of embryonic and larval development of crucian carp, *Carassius carassius* (L.) with a note on species identification.
10. Odunayo Ibraheem Azeez, Roy Meintjes and Joseph Panashe Chamunorwa(2014) Fat body, fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: the nexus

11. Sander Kersten (2001) Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis.
12. Stephane Gesta, Yu-Hua Tseng, C. Ronald Kahn (2008) Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source
13. Edward J. Flynn, Chad M. Trent, John F. Rawls (2009) Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*)
14. Claudine Weil, Florence Lefevre , Jerome Bugeon (2012) Characteristics and metabolism of different adipose tissues in fish
15. Kristina Schoonjans, Bart Staels, and Johan Auwerx (1996) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression . The Journal of Lipid Research
16. I. Cunha, S. Galante-Oliveira, E. Rocha, M. Planas, R. Urbatzka, L.F.C. Castro (2013) Dynamics of PPARs, fatty acid metabolism genes and lipid classes in eggs and early larvae of a teleost Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology Volume 164, Issue 4
17. Marjo J. Den Broeder, Victoria A. Kopylova, Leonie M. Kamminga, Juliette Legler (2015) Zebrafish as a Model to Study the Role of Peroxisome Proliferating-Activated Receptors in Adipogenesis and Obesity
18. Antonio Vidal-Puig, Mercedes Jimenez-Liñan, Bradford B. Lowell, Andreas Hamann, Erding Hu, Bruce Spiegelman, Jeffrey S. Flier, David E. Moller (1996) Regulation of PPAR $\gamma$  Gene Expression by Nutrition and Obesity in Rodents
19. Rebecca Wafer, Panna Tandon, James E. N. Minchin (2017) The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARG) in Adipogenesis: Applying Knowledge from the Fish Aquaculture Industry to Biomedical Research
20. Peter Tontonoz, Erding Hu, Bruce M. Spiegelman (1994) Stimulation of Adipogenesis in Fibroblasts by PPAR $\gamma$ 2, a Lipid-Activated Transcription Factor , Cell Volume 79, Issue 7, p1147–1156

21. Evan D. Rosen, Bruce M. Spiegelman (2000) Molecular Regulation Of Adipogenesis
22. Mohamed-Ali, JH Pinkney, SW Coppack (1998) Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ
23. Jaswinder K. Sethi, Gokhan S. Hotamisligil (1999) The role of TNF $\alpha$  in adipocyte metabolism CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Vol 10, 1999: pp. 19-29
24. Suhee Hong, Ronggai Li, Qiaoqing Xu, Chris J. Secombes (2017) Two Types of TNF- $\alpha$  Exist in Teleost Fish: Phylogeny, Expression, and Bioactivity Analysis of Type-II TNF- $\alpha$ 3 in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*
25. Xiuping Chen, Keli Xun, Lidian Chen, Yitao Wang (2009) TNF- $\alpha$ , a potent lipid metabolism regulator
26. Dongwu Liu, Kangsen Mai, Qinghui A (2014) Tumor necrosis factor alpha is a potent regulator in fish adipose tissue Aquaculture 436 (2015) 65–71
27. Gema FruHbeck, Javier GoMez-Ambrosi, Francisco Jose Muruza Bal, Maria Angela Burrell (2001) The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation.
28. Donald L. Copeland, Robert Joel Duff, Qin Liu, Jeremy Prokop, Richard Lyle Londraville (2011) Leptin in teleost fishes: an argument for comparative study
29. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR
30. Stella Georgiou, Hélène Alami-Durante, Deborah M. Power, Elena Sarropoulou, Zissis Mamuris, Katerina A. Moutou (2015) Transient up- and down-regulation of expression of myosin light chain 2 and myostatin mRNA mark the changes from stratified hyperplasia to muscle fiber hypertrophy in larvae of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)
31. Shengying Zhou, Robert G. Ackman, and Carol Morrison (1996) Adipocytes and lipid distribution in the muscle tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar*), vol. 332, pp 326-332

32.     **Josep M. Argiles, Joaquin Lopez-Soriano, Vanessa Almendro, Silvia Busquets (2004) Cross-Talk Between Skeletal Muscle and Adipose Tissue: A Link With Obesity?**
33.     A. Rowlaerson, A. Veggetti (2001) Cellular Mechanisms Of Post-Embryonic Muscle Growth In Aquaculture Species Fish Physiology Volume 18 Muscle Development And Growth
34.     Francesco Mascarello, Anthea Rowlerson, Giuseppe Radaelli, Pier-Augusto Scapolo, Alba Veggetti (1994) Journal of Muscle Research & Cell Motility Volume 16, Issue 3, pp 213–222
35.     Whalen RG, Sell SM, Butler-Browne GS, Schwartz K, Bouveret, Pinset-Härström I (1981) Three myosin heavy chain isozymes appear sequentially in rat muscle development. Nature 292: 805–809
36.     Zhang W, Behringer RR, Olson EN (1995) Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and ribonucleic acid anomalies. Genes Dev 9: 1388–1399
37.     Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe, Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3: research0034